

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENATA RANK DE MIRANDA

**Respostas biológicas de *Prochilodus lineatus* frente a
nanopartículas agregadas de dióxido de titânio e óxido de zinco**

CURITIBA

2013

RENATA RANK DE MIRANDA

**Respostas biológicas de *Prochilodus lineatus* frente a
nanopartículas agregadas de dióxido de titânio e óxido de zinco**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular da Universidade
Federal do Paraná

Orientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto

CURITIBA

2013

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Miranda, Renata Rank de

Respostas biológicas de *Prochilodus lineatus* frente a nanopartículas agregadas de dióxido de titânio e óxido de zinco. / Renata Rank de Miranda. – Curitiba, 2013.

64f. : il. ; 30cm.

Orientador: Francisco Filipak Neto

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Nanopartículas. 2. Peixe. I. Título. II. Filipak Neto, Francisco. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.87

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Francisco Filipak Neto
Prof. Dr. Francisco Filipak Neto
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná

Daniel Bussolaro
Prof. Dr. Daniel Bussolaro
Instituto Federal Tecnológico do Paraná - IFPR

Rubens Bertazolli Filho
Prof. Dr. Rubens Bertazolli Filho
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Suplente:

Profa. Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir a mestrand **Renata Rank de Miranda**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Respostas biológicas de *Prochilodus lineatus* frente a agregados particulados de dióxido de titânio e óxido de zinco" são de parecer favorável à ~~aprovação~~ ^{aprovação} da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 25 de Fevereiro de 2013



AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof.^o Dr. Francisco (Chico), por sempre me ajudar em tudo que precisei, pela sua disponibilidade, orientação e paciência;

Ao Prof.^o Dr. Ciro;

À minha família, por sempre me apoiar e incentivar;

Aos amigos do laboratório de Toxicologia Celular: Halina, Carola, Débora, Flávia, Ellie, Samuel, Dandie, Loli, Dani, Andressa, entre outros, não apenas por toda ajuda em coletas e experimentos, mas também pela amizade;

Um agradecimento especial para Ana (Cuca) e Iza, por toda ajuda durante os bioensaios;

Ao Prof.^o Dr. Sandro e à Carmen, da UEPG, pela caracterização das nanopartículas; Científico Tecnológico (CNPQ) pelo suporte na realização do trabalho;

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná;

A Piscicultura Panamá;

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

"Would you tell me, please, which way I ought to go from here?"
"That depends a good deal on where you want to get to," said the Cat.
"I don't much care where--" said Alice.
"Then it doesn't matter which way you go," said the Cat.
"--so long as I get SOMEWHERE," Alice added as an explanation.
"Oh, you're sure to do that," said the Cat, "if you only walk long enough."

(Alice's Adventures in Wonderland, Lewis Carroll)

RESUMO

A produção e consumo crescentes de produtos que contêm nanopartículas resultam na liberação direta ou indireta desses materiais nos ambientes naturais. Os nanometais, como o de zinco (Zn), titânio (Ti) e seus óxidos, estão entre as nanopartículas mais utilizadas, tendo aplicações em diversas áreas, e estima-se que ambos poderão vir a ser encontrados em ambientes aquáticos na ordem de microgramas por litro de água. No entanto, pouco se sabe a respeito de seus efeitos em animais aquáticos. Desta forma, este trabalho tem como objetivo investigar os efeitos de nanopartículas de TiO_2 e ZnO em *Prochilodus lineatus*, espécie de teleósteo amplamente distribuída na América do Sul. Para tanto, os peixes foram expostos aos nanometais em bioensaios durante 5 e 30 dias às concentrações de 0,1 $\mu\text{g/l}$, 1,0 $\mu\text{g/l}$ e 10 $\mu\text{g/l}$ de TiO_2 ; 7 $\mu\text{g/l}$, 70 $\mu\text{g/l}$ e 700 $\mu\text{g/l}$ de ZnO ; e associação de TiO_2 e ZnO nas concentrações de 1 $\mu\text{g/l}$ e 70 $\mu\text{g/l}$, respectivamente. Após cada período de exposição, o fígado, cérebro, músculo e brânquias foram coletados e submetidos a análises histopatológicas, bioquímicas, com foco no estresse oxidativo e de neurotoxicidade. A caracterização das suspensões estoque indicou que as nanopartículas são instáveis e tendem a formar agregados em meio aquoso capazes de provocar efeitos nocivos em *P. lineatus*. A ocorrência de estresse oxidativo foi observada devido ao aumento nos níveis de carbonilação de proteínas após a exposição aguda ao ZnO no cérebro, subcrônica no fígado e após ambas nas brânquias. No fígado, o sistema antioxidante, representado pela glutathione, foi eficiente em eliminar as espécies reativas de oxigênio produzidas por TiO_2 ; no entanto, as concentrações dessa molécula mantiveram-se inalteradas após as exposições ao ZnO . A AchE apresentou redução de atividade após exposição aguda no cérebro (nos grupos expostos à mistura de ZnO e TiO_2 e a 7 e 700 $\mu\text{g/l}$ de ZnO) e no músculo após a exposição ao TiO_2 . Referente à histopatologia do fígado, diferença significativa entre o grupo exposto a 70 $\mu\text{g/l}$ de ZnO e o controle foi encontrada após a exposição subcrônica, enquanto a exposição aguda afetou animais expostos a 0,1 $\mu\text{g/l}$ de TiO_2 e 700 $\mu\text{g/l}$ de ZnO . Quanto às misturas, foram observados efeitos contrários daqueles induzidos pelas partículas isoladas, no fígado e cérebro. A partir desses dados supõe-se que o material particulado pode ter sido absorvido pelos animais. Já para as brânquias, as lesões encontradas poderiam ser decorrentes do seu contato direto com os agregados nanoparticulados NPs. As respostas obtidas por esses biomarcadores permitem assumir que as nanopartículas de TiO_2 e ZnO não são inócuas, mesmo em concentrações realísticas. *P. lineatus*.

Palavras-chave: nanopartículas, ZnO , TiO_2 , peixes, ERO

ABSTRACT

The increase in production and consumption of products that contain nanoparticles results, directly or indirectly, in the increased release of these materials into natural environments. Nanometals, such as zinc (Zn) and titanium (Ti), are among the most widely utilized nanoparticles, with applications in several areas so that they are expected to be found in aquatic environment at concentrations of micrograms per liter. However, little is known about their effects in aquatic animals. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles to *Prochilodus lineatus*, a widely distributed fish species in South America. Fish were exposed to either 0.1 µg/l, 1.0 µg/l and 10 µg/l of TiO₂; 7 µg/l, 70 µg/l and 700 µg/l of ZnO; or the association of 70 µg/l of ZnO and 1 µg/l of TiO₂, for up to 5 and 30 days. After the exposure, liver, brain, muscle and gills were collected and submitted to biochemical and histopathological analyses. Characterization of the stock suspensions showed that these nanoparticles are unstable and tend to aggregate in water. However, these aggregates were capable to induce harmful effects in *P. lineatus*. Oxidative stress was confirmed by the increase of protein carbonyl levels in the brain, liver and gills. Glutathione was efficient in eliminating the reactive oxygen species produced by TiO₂. On the other hand, no disturbances were observed in glutathione after ZnO exposure. AchE activity was reduced after acute exposure to 7 and 700 µg/l of ZnO ZnO, as well as to the association in the brain, and after TiO₂ acute exposure in the muscle. Liver histopathological analyses revealed significant differences between the control group and those acutely exposed to 0,1 µg/l of TiO₂ and 700 µg/l of ZnO, as well as subchronically exposed to 70 µg/l of ZnO, after. The association of ZnO and TiO₂, induced the opsite effect in the liver and brain. Based on these data, we suppose that the nanoparticulated material may have been absorbed by the fish. Conversely, gills damage may happen through in direct contact with the nanoparticles. Overall, the results of this work allow to assume that TiO₂ and ZnO nanoparticles are not harmless to *P. lineatus*, even when present at realistic concentrations.

Key words: nanoparticles, ZnO, TiO₂, fish, ROS

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01. Espécime de <i>Prochilodus lineatus</i> – curimbatá.....	19
FIGURA 02. Piscicultura Panamá.....	24
FIGURA 03. Laboratório de Bioensaios – UFPR.....	24
FIGURA 04. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos agregados de TiO ₂ e de ZnO	30
FIGURA 05. Distribuição do tamanho de nanopartículas de TiO ₂	31
FIGURA 06. Distribuição do tamanho de nanopartículas de ZnO.....	31
FIGURA 07. Taxa de mortalidade (%) após a exposição subcrônica às nanopartículas de ZnO e TiO ₂ . Concentrações em µg/l.....	32
FIGURA 08. Atividade da AchE muscular de <i>P. lineatus</i> após exposição aguda às NPs.....	33
FIGURA 09. Atividade da AchE muscular de <i>P. lineatus</i> após exposição subcrônica às NPs.....	33
FIGURA 10. Atividade da AchE cerebral de <i>P. lineatus</i> após exposição aguda às NPs.....	34
FIGURA 11. Atividade da AchE cerebral de <i>P. lineatus</i> após exposição subcrônica às NPs.....	34
FIGURA 12. GSH em fígado de <i>P. lineatus</i> após exposição aguda às NPs.....	35
FIGURA 13. GSH em fígado de <i>P. lineatus</i> após exposição subcrônica às NPs.....	35
FIGURA 14. LPO em fígado de <i>P. lineatus</i> após exposição aguda às NPs.....	36
FIGURA 15. LPO em fígado de <i>P. lineatus</i> após exposição subcrônica às NPs.....	36
FIGURA 16. LPO em brânquia de <i>P. lineatus</i> após exposição aguda às NPs.....	37
FIGURA 17. LPO em brânquia de <i>P. lineatus</i> após exposição subcrônica às NPs.....	37
FIGURA 18. PCO em fígado de <i>P. lineatus</i> após exposição aguda às NPs.....	38
FIGURA 19. PCO em fígado de <i>P. lineatus</i> após exposição subcrônica às NPs.....	38

FIGURA 20. PCO em cérebro de <i>P. lineatus</i> após exposição aguda NPs.....	39
FIGURA 21. PCO em cérebro de <i>P. lineatus</i> após exposição subcrônica NPs.....	39
FIGURA 22. PCO em brânquia de <i>P. lineatus</i> após exposição aguda NPs.....	40
FIGURA 23. PCO em brânquia de <i>P. lineatus</i> após exposição subcrônica NPs.....	40
FIGURA 24. Corte histológico de <i>P. lineatus</i> expostos às NPs identificando as principais lesões após ambas as exposições.....	44
FIGURA 25. Índice de lesões do fígado de <i>P. lineatus</i> após exposição aguda.....	45
FIGURA 26. Índice de lesões do fígado de <i>P. lineatus</i> após exposição subcrônica.....	45
FIGURA 27. Eletromicrografias de brânquias de <i>P. lineatus</i> após exposição aguda indicando as principais alterações.....	47
FIGURA 28. Eletromicrografias de brânquias de <i>P. lineatus</i> após exposição subcrônica indicando as principais alterações.....	48
FIGURA 29. Eletromicrografias de brânquias de <i>P. lineatus</i> indicando a presença de NPs no epitélio respiratório.....	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Concentrações previstas de nanomateriais no ambiente (tabela extraída de PÉREZ et al., 2009).....	18
TABELA 2. Fator de importância de acordo com o tipo de alteração no fígado para as análises de alterações histopatológicas (Bernet et al., 1999).....	29
TABELA 3. Resumo dos resultados das análises bioquímicas.....	41
TABELA 4. Número de indivíduos com ocorrência histopatológica no fígado para o total de exemplares analisados após a exposição aguda.....	43
TABELA 5. Número de indivíduos com ocorrência histopatológica no fígado para o total de exemplares analisados após a exposição subcrônica.	43

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach - Acetilcolina

AchE – Acetilcolinesterase

BHT – Butilato de hidroxitolueno

BSA – Soro de albumina bovina

DNPH - 2,4-dinitrofenil-hidrazina

DTNB – Ácido-5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EROs – Espécies reativas de oxigênios

FOX – do inglês *Ferrous Oxidation/ Xylenol Oxide Method*

GSH – Glutathiona reduzida

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

LPO – Peroxidação lipídica

NP – Nanopartícula

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MS222 – ácido etil-éter-3-amino-benzóico

PBS - Tampão fosfato salina

PCO – Carbonilação de proteínas

Potencial ζ – Potencial Zeta

OH• - Radical hidroxila

TCA – Ácido tricloroacético

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Nanotecnologia	13
1.2. Nanotoxicologia e meio ambiente	15
1.3. Nanometais	16
1.4. Modelo Experimental	18
1.5. Biomarcadores	19
1.5.1. Biomarcadores Bioquímicos	19
1.5.2. Biomarcadores histopatológicos	21
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivos gerais	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Preparo das suspensões e caracterização das nanopartículas	23
3.2. Desenho experimental	23
3.3. Microscopias	24
3.3.1. <i>Microscopia de luz</i>	25
3.3.2. <i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	25
3.4. Análises bioquímicas	26
3.4.1. Danos em biomoléculas	26
3.4.1.1. <i>Lipídeos</i>	26
3.4.1.2. <i>Carbonilação de Proteínas</i>	26
3.4.1.3. <i>Tióis não Proteicos</i>	27
3.4.2. Atividade da acetilcolinesterase	27
3.5. Concentração de proteínas totais	28
3.6. Análises estatísticas	28
4. RESULTADOS	30
4.1. Caracterização das nanopartículas	30
4.2. Taxa de Mortalidade	31
4.3. Atividade da AchE	32
4.4. Tióis não proteicos	34
4.5. Peroxidação lipídica	35

4.6. Carbonilação de proteínas.....	37
4.7. Histopatologia.....	42
4.6.1. <i>Microscopia de luz</i>	42
4.6.2. <i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	46
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

Partículas em nanoescala estão presentes naturalmente na Terra como produtos da combustão incompleta de combustíveis fósseis e erupção vulcânica, e têm sido utilizadas pela humanidade para fins diversos (NOWACK e BUCHELI, 2007). No entanto, nas últimas duas décadas as nanopartículas vêm sendo produzidas industrialmente graças ao desenvolvimento da nanotecnologia, que se refere ao desenvolvimento da pesquisa e tecnologia, ao processo de fabricação e manipulação da matéria em escala atômica (EPA, 2007).

Nanomateriais apresentam entre 1 e 100 nm em pelo menos uma de suas dimensões. Nessas dimensões, a razão entre área e volume aumenta consideravelmente; enquanto cerca de 1% dos átomos ocupam a superfície em micropartículas, em torno de 10 a 40% ocupam essa região em uma nanopartícula de metal de 10 nm de diâmetro (NEL *et al.*, 2006; GRAINGER e CASTNER, 2008). Essa característica confere a esses materiais em nanoescala propriedades físicas, químicas, elétricas, catalíticas e mecânicas fundamentalmente diferentes daquelas apresentadas pelo material correspondente em micro e macroescala. Por exemplo, partículas de ouro em macroescala são quimicamente inertes e resistentes à oxidação, enquanto que nanopartículas de ouro tem uma superfície quimicamente ativa (DANIEL e ASTRUC, 2004; WANG e RO, 2006).

No entanto, muitos estudos já demonstraram que essas mesmas propriedades responsáveis pelo avanço técnico da nanotecnologia são também responsáveis por efeitos biológicos adversos, não observados no material em tamanho convencional (NEL *et al.*, 2006).

1.1. Nanotecnologia

Atualmente, a nanotecnologia é um dos campos mais promissores da ciência e tecnologia com aplicações em diferentes áreas como industrial, militar, eletrônica, biomédica, farmacêutica, cosmética e ambiental. Devido ao potencial desta tecnologia, investimentos crescentes vêm sendo realizados no mundo todo, principalmente por países como Estados Unidos, Japão, Alemanha e Coreia do Sul.

No entanto, a pesquisa relacionada à verificação da segurança ambiental e humana dos produtos e resíduos da nanotecnologia não tem recebido a devida atenção (GUZMAN *et al.*, 2006).

Estima-se que mais de 1.000 produtos destinados ao consumidor já faziam uso de nanotecnologia em 2007 (WOODROW WILSON DATABASE) o que representou um valor de 147 bilhões de dólares naquele ano; esse valor deverá subir para mais de três trilhões de dólares por volta de 2015 (LUX REPORT, 2008), ano em que mais de 15% de todos os produtos no mercado mundial terão algum tipo de nanotecnologia incorporada ao seu processo de produção (DAWSON, 2008). Outras previsões apontam um aumento na produção de nanomateriais de 2000 toneladas por ano em 2004, para 58000 toneladas por ano entre 2011 e 2020 (MAYNARD, 2006).

Esse aumento na produção e utilização de nanomaterias resultará no aumento da contaminação de ambientes naturais, sobretudo os aquáticos, que estarão sujeitos a contaminação por produtos e resíduos nanotecnológicos, seja durante o processo de produção, transporte e utilização ou indiretamente por descarte dos produtos pelos consumidores após o uso (THE ROYAL SOCIETY AND ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004; MULLER e NOWACK, 2008). O destino, transporte e efeitos biológicos de nanopartículas no ambiente têm recebido especial atenção da *EPA (US Enviromental Protection Agency)* e da Comunidade Européia, e esses aspectos dependem do tipo de nanomaterial em questão.

Os nanomateriais podem ser separados de acordo com a sua composição química entre aqueles que contêm carbono e os inorgânicos. Existem os nanomateriais baseados em carbono (fulerenos e nanotubos), em metais (nanometais, seus óxidos e os *quantum dots*), os dendrímeros (polímeros construídos de unidades ramificadas) e os compostos (combinam nanopartículas com outras nanopartículas ou com materiais de maior escala). Acredita-se que cada um desses diferentes nanomateriais represente diferentes graus de risco a saúde ambiental.

1.2. Nanotoxicologia e o Meio Ambiente

O termo nanotoxicologia surgiu apenas recentemente, muitos anos após o primeiro “boom” de desenvolvimento da nanotecnologia, quando vários tipos nanomateriais já haviam sido incorporados em inúmeros processos industriais e produtos (DONALDSON *et al.*, 2004), e inevitavelmente, liberados no ambiente. Desde então, a investigação do potencial tóxico de nanomaterias tem tentado alcançar o rápido crescimento da nanotecnologia (STONE *et al.*, 2006).

Devido à alta razão entre a área de superfície e o volume, as nanopartículas possuem uma alta reatividade. Essa alta reatividade pode potencialmente levar à toxicidade, através de interações nocivas de nanopartículas com sistemas biológicos e com o ambiente (OBERDORSTER *et al.*, 2005).

Quando expostos à luz e metais de transição, as nanopartículas podem promover a formação de agentes pró-oxidantes como espécies reativas de oxigênio (EROs) que desestabilizam o balanço redox celular (CURTIS *et al.*, 2006). Características como tamanho, forma e agregação das nanopartículas irão ditar a formação das EROs (SHVEDOVA *et al.*, 2005; ARORA *et al.*, 2012).

No entanto, a toxicidade das nanopartículas depende, inicialmente, da sua biodisponibilidade e esta é controlada principalmente pelo potencial de dispersão desses materiais. A dispersão é uma propriedade importante das nanopartículas que afeta seu modo de ação e que depende tanto de suas características intrínsecas (tamanho, forma, superfície e carga) quanto do meio em que ela encontra-se (pH, força iônica, presença de material orgânico e temperatura) (MISRA *et al.*, 2012; ELAESSER *et al.*, 2012).

Em ambiente aquático, as nanopartículas tendem a interagir entre si e com fatores bióticos e abióticos do meio e, conseqüentemente, formar agregados (BAUN *et al.*, 2008). Esses agregados podem apresentar micrômetros de diâmetro, o que pode resultar na sua sedimentação. Desta forma, apenas uma pequena parcela das nanopartículas estará suspensa e em tamanho adequado para uma possível entrada nos organismos (através de fenestrações nas brânquias ou pela superfície epitelial) no meio aquático (ADAMS *et al.*, 2006; BAVEYE AND LABA, 2008). Por outro lado, esses agregados tornam-se disponíveis para organismos bentônicos, podendo atingir o interior dos organismos através da alimentação.

No interior dos organismos vários fatores podem influenciar na estabilidade das nanopartículas. Normalmente, o meio fisiológico tem forças iônicas diferentes do meio no qual as NPs estavam inicialmente dispersas, podendo resultar na sua agregação. O mesmo é observado para variações no pH. No sangue, as NPs podem adsorver proteínas plasmáticas (opsonização) de modo não específico e quando esse processo ocorre, observa-se uma rápida eliminação das NPs (FIGUEROLA *et al.*, 2010).

Assim, as nanopartículas podem se encontrar em diferentes estados: isoladas em suspensão, agregadas em suspensão, isoladas e precipitadas, agregadas e precipitadas ou ainda uma combinação destas formas. Isso, por conseguinte, afeta a biodisponibilidade, rota e taxa de entrada nos organismos e a toxicidade das nanopartículas e agregados (nano) particulados.

1.3. Nanometais

Os nanometais, como titânio (Ti), zinco (Zn) e seus óxidos (TiO₂ e ZnO) estão entre os nanomateriais mais utilizados, com aplicações em diversas áreas (AITKEN *et al.*, 2006). O nano Zn é utilizado como catalisador altamente reativo na reação de hidrogênio inorgânico, em pinturas e pigmentos e em aditivos metalúrgicos. Já o óxido de zinco (ZnO) possui propriedades cerâmicas com aplicações em semicondutores e pigmentos, produção de sensores químicos, células solares além de protetores solares, cosméticos e roupas (SINGH *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2008). Nanopartículas de TiO₂ são muito utilizadas em tintas, papel, plástico, roupas, como aditivo alimentar e em uma ampla variedade de cosméticos, como por exemplo, protetores solares, e também na remediação ambiental por provocar a mineralização de poluentes orgânicos indesejados (MACH, 2004; OBERDORSTER *et al.*, 2005; ADAMS *et al.*, 2006).

Como já mencionado, esses nanometais estão entre as principais nanopartículas produzidas, e suas inúmeras aplicações podem oferecer riscos aos seres que vivem em ambientes que recebem essas nanopartículas. Do mesmo modo como vem ocorrendo para outros contaminantes, o ambiente aquático será, direta ou indiretamente, o principal receptáculo dessas nanopartículas.

Até recentemente, havia apenas suposições sobre a possibilidade de algumas nanopartículas atingirem o ambiente aquático. No entanto, KAEGLI *et al.* (2008) demonstraram que o nano TiO₂ utilizado como pigmento branqueador de tintas empregadas na pintura de fachadas de casas acabavam sendo carregadas até corpos d'água. As concentrações dessas nanopartículas encontradas corroboraram com as propostas no modelo de exposição de MUELLER e NOWACK (2008), na ordem de microgramas por litro para corpos d'água, o que reacende a discussão sobre os possíveis efeitos nocivos dessas nanopartículas, visto que este estudo gerou evidências concretas da possibilidade de contaminação ambiental com concentrações relevantes de nanopartículas.

Em ambiente aquoso, o TiO₂ produz o radical hidroxila (OH•) ao absorver luz ultravioleta e esse radical é um importante agente oxidante que pode levar a inibição de enzimas antioxidantes e danos a biomoléculas como já relatado para lipídeos, proteínas, carboidratos e DNA (DUNFORD *et al.*, 1995; GURR *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2007). No caso do ZnO, a liberação de íons contribui em grande parte, se não completamente, para a sua toxicidade (LI *et al.*, 2008).

Os nanometais são capazes de atingir o citoplasma de células eucarióticas pela via endocítica (NA *et al.*, 2003; MOORE, 2006; NOWACK e BUCHELI *et al.*, 2007). Os pulmões, brânquias e intestino são importantes vias de absorção de nanopartículas que, através de fenestrações, podem atingir a corrente sanguínea e serem transportadas a diversos órgãos e tecidos, como fígado, rins e cérebro (ARTELT *et al.*, 1999; TAKENAKA *et al.*, 2001; NEMMAR *et al.*, 2002; SHIMADA *et al.*, 2006).

Esses dados, embora sejam muito importantes para a compreensão da ação de nanopartículas nos sistemas biológicos, apresentam uma limitação quanto ao risco real ao qual os organismos estarão sujeitos, que é a concentração a que de fato esses organismos estarão expostos. Na grande maioria dos estudos sobre os efeitos de nanopartículas em sistemas biológicos, as concentrações empregadas são na ordem de miligrama por litro ou por quilograma nos ensaios *in vivo* ou micrograma por mililitro nos ensaios *in vitro*, o que deve superar as concentrações de nanopartículas que poderão vir a serem encontradas no ambiente esperadas (tabela 1).

Tabela 1 - Concentrações previstas de nanomateriais no ambiente (tabela extraída de PÉREZ et al., 2009)

Table 1. Predicted concentrations of nanomaterials in the environment. Extracted from soil, water and air [11,12]			
Type of nanomaterial	Water [µg/L]	Soil [µg/kg]	Air [µg/m ³]
Ag	0.010–0.03	0.02–0.43	0.0017–0.0014
AlO ₃	0.0002	0.01	
Au	0.14	5.99	
Carbon nanotubes	0.0005–0.0008	0.001–0.02	0.0015–0.0023
CeO ₂	<0.0001	<0.01	
Fullerenes	0.31	13.1	
Hydroxyapatite	10.1	422	
Latex	103	4307	
Organo-silica	0.0005	0.02	
SiO ₂	0.0007	0.03	
TiO ₂	0.7–24.5	0.4–1030	0.0015–0.042
ZnO	76	3194	

1.4. Modelo Experimental

Vários estudos utilizam os peixes para a análise de respostas biológicas e bioquímicas após a exposição a contaminantes de ambientes aquáticos. Uma das principais razões para isso é que esses animais são encontrados virtualmente em todos os ambientes aquáticos e desempenham um papel ecológico importante nas cadeias alimentares aquáticas, por transferir a energia dos níveis tróficos mais baixos aos mais altos (BEYER, 1996; VAN DER OOST e BEYER, 2003).

Os bioensaios oferecem muitas vantagens para determinar a toxicidade relativa de compostos tóxicos específicos. No entanto, apresentam limitações, principalmente no que diz respeito ao monitoramento biológico, pois não levam em consideração, por exemplo, a especificação do contaminante no ambiente, adsorção por compostos no sedimento e acumulação através da cadeia alimentar (MCCARTY e SHUGART, 1990).

A espécie utilizada como modelo experimental foi *P. lineatus* (Figura 1) (VALENCINNES, 1847), popularmente conhecido como curimatá, um teleósteo dulcícola de ampla distribuição na América do Sul. Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil a espécie possui valor econômico significativo para alimentação humana. São animais particularmente úteis ao monitoramento ambiental, pois apresentam hábito bentônico e detritívoro, ou seja, alimentam-se de nutrientes que se depositam no sedimento, onde também se depositam poluentes, incluindo nanopartículas. Além disto, esses animais são sensíveis a variações da qualidade da água (CAMARGO e MARTINEZ, 2006).



FIGURA 1 – exemplar de *Prochilodus lineatus*. (FONTE: autor)

1.5. Biomarcadores

Biomarcadores são definidos como respostas biológicas (desde respostas moleculares, celulares, fisiológicas até comportamentais) que podem ser relacionadas à exposição ou efeitos tóxicos de agentes químicos ambientais (PEAKALL, 1994). São também muito utilizados em estudos de efeitos toxicológicos *in vivo* em laboratório sob condições controladas, cujos resultados podem, com devidas validações e cuidados, ser extrapolados para o ambiente natural.

1.5.1 Biomarcadores bioquímicos

As nanopartículas são capazes de atravessar a barreira da membrana plasmática por difusão ou endocitose (LYNCH *et al.*, 2006; ROTHERN-RUTISHAUSER *et al.*, 2006). Uma vez no interior das células, as nanopartículas podem ser encontradas em diferentes organelas - como vesículas e mitocôndrias - e capazes de desencadear a geração de EROs (NEL *et al.*, 2006).

O processo de peroxidação de lipídeos (LPO) é um bom biomarcador de estresse oxidativo. A LPO pode ser causada por um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Quando ácidos graxos são peroxidados,

tornam-se mais hidrofílicos, o que perturba propriedades como fluidez e permeabilidade das membranas celulares (ACWORTH e BAILEY, 1995), trazendo sérias consequências para o funcionamento celular.

As EROs também são capazes de provocar mudanças químicas na estrutura de proteínas. Estas, podem sofrer o processo de carbonilação, no qual ocorrem modificações nas cadeias laterais de aminoácidos, formando grupamentos do tipo carbonilas. Esse processo pode resultar em mudanças na estrutura da proteína e, conseqüentemente, alterar o funcionamento normal da célula (QUINLAN e GUTTERIDGE, 2000).

Outro biomarcador de estresse oxidativo é a glutathiona (GSH). É encontrada nas formas reduzida (GSH) ou de dissulfeto (GSSG), sendo que o par GSH/GSSG age de forma significativa na manutenção celular, visto que é o principal responsável pelo potencial redox de um sistema biológico. Além disso, a glutathiona é um tripeptídeo que possui um papel fundamental na fase II de biotransformação, agindo como cofator para ação da enzima glutathiona S-transferase (STEGEMAN *et al.*, 1992; COMMANDEUR *et al.*, 1995). A GSH participa ainda na redução do H_2O_2 em H_2O pela glutathiona peroxidase e reage com o radical hidroxila, gerando sua forma dissulfeto (GSSG). Desta forma, a análise da concentração do GSH é um biomarcador fundamental para a verificação do ambiente redox.

A ação neurotóxica das nanopartículas pode ser avaliada através do ensaio que mede a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor presente tanto no cérebro quanto no músculo de peixes (STURM *et al.*, 2000).

A AChE é responsável por degradar a ACh nas terminações nervosas, impedindo a estimulação contínua da célula pós-sináptica, o que é essencial para o funcionamento sensorial e neuromuscular normal (MURPHY, 1986). Vários estudos já demonstraram que pesticidas organofosforados são inibidores da AChE (ARUFE *et al.*, 2007), além de metais, detergentes, toxinas de algas e hidrocarbonetos (KOPECKA E PEMPKOWIAK, 2008). Wang *et al.* (2009) demonstrou que diversos tipos de nanopartículas podem reduzir a atividade da AChE *in vitro*. No entanto, não foram encontrados estudos que relatem o efeito de nanopartículas sobre essa enzima *in vivo*.

1.5.2 Biomarcadores Histopatológicos

A histopatologia permite a identificação eficiente dos efeitos subletais agudos e (sub) crônicos dos contaminantes de modo relativamente rápido e de baixo custo. As alterações histopatológicas respondem a baixas concentrações de agentes tóxicos, indicando contaminações ou situações de estresse precocemente (BERNET *et al.*, 1999).

O fígado é o principal órgão responsável pelos mecanismos de biotransformação de poluentes em vertebrados e, portanto, apresenta-se como um importante órgão-alvo da toxicidade destes agentes químicos. Consequentemente, o fígado é um órgão imprescindível para estudos de danos resultantes da exposição a diferentes contaminantes (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005; RABITTO *et al.*, 2011).

As brânquias dos peixes são órgãos respiratórios e participam de vários processos fisiológicos, como osmorregulação, equilíbrio ácido-base e excreção de compostos nitrogenados, desempenhando, portanto, um papel vital para esses organismos. Por estarem em contato direto com a água, são diretamente afetadas por contaminantes dissolvidos ou dispersos na coluna d'água (MACHADO, 1999; GARCIA-SANTOS *et al.*, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar as respostas biológicas e possíveis efeitos tóxicos de nanopartículas de TiO₂ e ZnO em *P. lineatus*

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar as nanopartículas de TiO₂ e ZnO em suspensão aquosa;
- Verificar os níveis de carbonilação de proteínas (PCO) no fígado, cérebro e brânquias de *P. lineatus* após as exposições aguda e subcrônica às nanopartículas de TiO₂ e ZnO na água;
- Verificar os níveis de peroxidação lipídica (LPO) no fígado e brânquias de *P. lineatus* após exposição;
- Quantificar os níveis de tióis não proteicos no fígado de *P. lineatus* após exposição;
- Determinar os efeitos neurotóxicos da exposição através da atividade da enzima acetilcolinesterase no cérebro e músculo em *P. lineatus*;
- Avaliar histopatologicamente o fígado e brânquias de *P. lineatus* após exposição.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Preparo das suspensões e caracterização das nanopartículas

As nanopartículas de TiO_2 (com tamanhos médios de 21 nm e área de superfície de 35-65 m^2/g) e ZnO (com partículas menores que 100 nm e área de superfície de 15-25 m^2/g) foram obtidas comercialmente da Sigma -Aldrich®.

Duas suspensões estoque, de 10 mg/L de TiO_2 e 7 g/L de ZnO , foram preparadas em água ultra-pura e dispersadas com ultrassom de sonda (20 ciclos de 2 min cada em potência de 100 W) antes das exposições aguda e subcrônica e sonicadas semanalmente durante a exposição subcrônica.

Essas suspensões foram caracterizadas de acordo com o formato das partículas, determinado por microscopia eletrônica de transmissão JEOL 1200 EXII no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR e, de acordo com a distribuição de tamanhos das partículas e o potencial zeta (ζ), através *Zeta-sizer* no Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG.

3.2. Desenho Experimental

Os peixes da espécie *P. lineatus* (\approx 10 cm de comprimento total) foram obtidos na Piscicultura Panamá, em Paulo Lopes – SC (Figura 2), transportados ao Laboratório de Bioensaios localizado no Departamento de Biologia Celular da UFPR (Figura 3) e separados em aquários de 25 L (8 peixes por aquário). Após aclimação por 15 dias, os peixes foram expostos durante 5 (exposição aguda) e 30 (exposição subcrônica) dias, às seguintes concentrações e associações de agregados de nanopartículas em água: 0,1 $\mu\text{g}/\text{L}$, 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ e 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ de TiO_2 ; 7 $\mu\text{g}/\text{L}$, 70 $\mu\text{g}/\text{L}$ e 700 $\mu\text{g}/\text{L}$ de ZnO ; e associação de 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ de TiO_2 e 70 $\mu\text{g}/\text{L}$ de ZnO . Esses valores foram escolhidos com base nas concentrações previstas para o ambiente, segundo Perez (tabela 1). O grupo controle foi mantido em paralelo, sem a exposição às nanopartículas. Os grupos expostos às nanopartículas e os grupos controle foram mantidos em duplicadas.

Os experimentos foram semi-estáticos, isto é, a água foi parcialmente trocada diariamente, com substituição de 50% do volume por água contendo nanopartículas para reposição das nanopartículas perdidas durante o processo de troca. Os parâmetros aeração e fotoperíodo (12 h claro / 12 h escuro) foram controlados e a alimentação feita com ração comercial para peixes uma vez a cada dois dias.

Após a exposição durante 5 e 30 dias, os peixes foram anestesiados em MS222 a 0,02% (*ethyl-ester-3-aminobenzoic acid*) e sacrificados por secção medular para coleta do material biológico.

Este trabalho obteve a aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO - UFPR), processo 23075.043642/2010-13.



FIGURA 2 - Piscicultura Panamá, em Paulo Lopes – SC. (FONTE: <http://www.pisciculturapanama.com.br>)



FIGURA 03. Laboratório de Bioensaios – UFPR (FONTE: Autora)

3.3. Microscopias

As amostras do segundo arco branquial e parte do fígado dos peixes foram coletadas, fixadas e processadas para as microscopias eletrônicas de varredura e de luz, respectivamente.

3.3.1. Microscopia de luz

Amostras de fígado foram fixadas em solução de Bouin por 24 h e mantidas em etanol 70%, desidratadas em série de etanol e xileno, incluídas em *paraplast plus*®. Em seguida, cortes de 5 µm de espessura foram feitos em micrótomo, diafanizados em xileno e coradas com Hematoxilina e Eosina. Finalmente, o material foi analisado em microscópio de luz.

3.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Amostras do segundo arco branquial de 4 peixes por grupo experimental foram coletadas e fixadas glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Essas amostras foram mantidas em tampão cacodilato e, posteriormente, desidratadas em série crescente de etanol (Merk®) e processadas até a completa desidratação no ponto crítico usando CO₂ líquido. Após esse procedimento, as amostras foram coladas em suporte de alumínio através de fita dupla-face e metalizadas com ouro para a posterior análise em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM – 6360 LV no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

3.4. Análises Bioquímicas

As amostras de fígado, cérebro, músculo e brânquias foram coletadas e homogeneizadas em diferentes tampões. O tampão fosfato salino (PBS, pH 7,2) foi empregado para fígado e brânquias e o tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,2 para cérebro e músculo. O homogenato foi centrifugado e o sobrenadante foi

aliquotado e congelado a -76°C até o momento das análises. Todas as análises foram realizadas através de métodos espectrofotométricos.

3.4.1. Danos em Biomoléculas

3.4.1.1. Lipídeos

Para verificar danos oxidativos em lipídeos foi empregado o método *FOX* (*Ferrous Oxidation/ Xylenol Orange Method*) segundo JIANG *et al.* (1991, 1992). Esse método baseia-se rápida oxidação do Fe^{+2} mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe^{+3} - laranja de xilenol na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado, que absorve luz a 550-570 nm. Inicialmente foram adicionados 800 μl do meio de reação (composto de laranja de xilenol a 100 μM , ácido sulfúrico a 25 mM, hidroxitolueno butilado (BHT) a 4 mM, sulfato ferroso amoniacal a 250 μM e metanol 90%) aos tubos com 200 μl do sobrenadante das amostras de fígado, brânquias e músculo, assim como aos tubos com 200 μl de tampão, correspondentes ao branco. Os tubos foram mantidos fechados, em temperatura ambiente, durante 20 min, e agitados por inversão a cada 3 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 9000 *g* por 10 min a temperatura ambiente e 200 μl do sobrenadante foi adicionado em microplaca, em triplicata, para leitura a 560 nm em espectrofotômetro.

3.4.1.2. Carbonilação de proteínas

A formação de EROs no interior celular pode provocar a carbonilação de proteínas. Durante esse processo ocorre a modificação de cadeias laterais de aminoácidos formando grupamentos do tipo carbonila (como aldeídos e cetonas). O método empregado baseia-se na reação do 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) com as proteínas carboniladas, formando dinitrofenil-hidrazonas, que podem ser detectadas a 358-370 nm (LEVINE *et al.* 1990; QUINLAN e GUTTERIDGE, 2000). Inicialmente, 200 μl do sobrenadante das amostras de fígado, brânquias, músculo e cérebro foram adicionadas a um tubo de 2 ml e, esses tubos receberam 500 μl de DNPH a

10 mM, preparados em HCL 2 M. Os tubos dos brancos não receberam a solução de DNPH, mas sim 500 µl de HCl 2 M. Concluída esta etapa, o conteúdo dos tubos foi misturado em *vortex* por 3 min e todos os tubos foram incubados a 30 °C por 90 min. Após a incubação, 700 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 28% foi adicionado aos tubos e estes foram centrifugados a 9000 g por 10 min. O precipitado foi lavado de 2 a 3 vezes por ressuspensão (em acetato de etila/etanol 1:1), misturado em *vortex* e centrifugado. As proteínas foram solubilizadas em cloreto de guanidina 6 M e centrifugadas a 9000 g por 3 min. O sobrenadante foi pipetado em microplaca, em duplicata, e o conteúdo de carbonilas foi determinado em espectrofotômetro a 360 nm. Os resultados estão expressos em nanomoles de carbonilas por miligramas de proteínas quantificadas após o ensaio.

3.4.1.3. Tióis não protéicos

Para determinar o conteúdo de tióis não protéicos (representados principalmente pela glutathiona), 50 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 48% foram adicionados em 250 µl de sobrenadante do fígado para a precipitação protéica. Em seguida, essas amostras foram centrifugadas a 1000 g por 15 min a 4 °C. Para as leituras, 50 µl do sobrenadante da amostra e 230 µl do tampão Tris-base (400 mM, pH 8,9) foram adicionados a uma microplaca. Nos tubos correspondentes ao branco, 230 µl de tampão Tris-base (400 mM, pH 8,9) mais 50 µl de TCA a 8% em PBS foram utilizados. Por ultimo, 20 µl de solução de DTNB (ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoato) a 2,5 mM (em metanol a 25% e tampão Tris-base 300 mM, pH 8,9) foram acrescentados aos poços da microplaca.. A determinação do conteúdo de tióis não protéicos (GSH e outros tióis) foi realizada através de leitura a 415 nm (SEDLAK e LINDSEY, 1968) e comparação com a curva-padrão de GSH.

3.4.2. Atividade da Acetilcolinesterase

O sobrenadante das amostras de músculo e cérebro foram diluídos a 1 mg de proteína por ml, em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5. Em seguida, 20 µl de amostra foi pipetada em triplicatas em microplaca, seguido de 130 µl de DTNB (5,5-

ditio-bis-2-nitro-benzoato a 0,75 mM em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5) e 50 µl de acetilcolina (a 9 mM em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca a 405 nm. Os resultados estão expressos em nmol por min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

3.5. Concentração de Proteínas totais

Inicialmente foram adicionados 10 µl do sobrenadante em microplaca seguidos de 250 µl do reativo de *Bradford* (“*Coomassie brilliant blue*” BG-250). Em seguida, foram realizadas leituras de absorbância na faixa de 595-620 nm. PBS foi usado como branco. A concentração de proteínas das amostras foi determinada pela comparação dos valores de absorbância obtidos das amostras com aqueles obtidos da curva-padrão de BSA (albumina de soro bovina), nas concentrações de 0, 125, 250, 500 e 1000 µl/ml (BRADFORD, 1976 com modificações para leitura em microplaca).

3.6. Análises estatísticas

Os resultados obtidos das análises bioquímicas foram analisados estatisticamente através do ANOVA paramétrica, seguida do pós-teste de *Dunnet* com nível de significância de 0,05 comparando cada uma das exposições ao grupo controle, e as exposições individuais a concentração intermediária das nanopartículas à sua associação.

Os resultados da microscopia de luz foram avaliados através do índice de alteração segundo Bernet *et al.* (1999), que é baseado na soma dos *rankings* de pontuação (baseado na porcentagem de lesões) e os fatores de importância determinados para cada lesão conforme os efeitos: mínimo (1), moderado (2) e severo (3) (Tabela 1). Utilizou-se a fórmula: $IL = \sum pr \sum alt (a \times w)$, onde: pr = padrão de reação, alt = alteração, a = valor atribuído à alteração e w = fator de importância (BERNET *et al.*, 1999). Os dados por serem não paramétricos foram avaliados pelo teste de *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn's*. Considerou-se um nível de significância estatística de 0,05.

Para a microscopia eletrônica de varredura, os resultados foram apenas descritivos.

Tabela 2 - Fator de importância de acordo com o tipo de alteração no fígado para as análises de alterações histopatológicas de acordo com Bernet et al. (1999).

Órgão	Tipo de alteração	Fator de importância (w)
Fígado	Necrose	3
	Infiltração leucocitária	2
	Degeneração celular	2
	Foco basófilo	2
	Congestão	1
	Colestase	1

Importância mínima (1), moderada (2) e severa (3).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das nanopartículas

A partir das soluções estoque, as suspensões de nanopartículas de TiO_2 e ZnO foram caracterizadas de acordo com seu formato, tamanhos e potencial ζ .

As imagens de microscopia de transmissão revelam que ambas as suspensões de nanopartículas de TiO_2 e ZnO formam agregados de tamanhos variáveis e apresentam formatos irregulares (Figura 4).

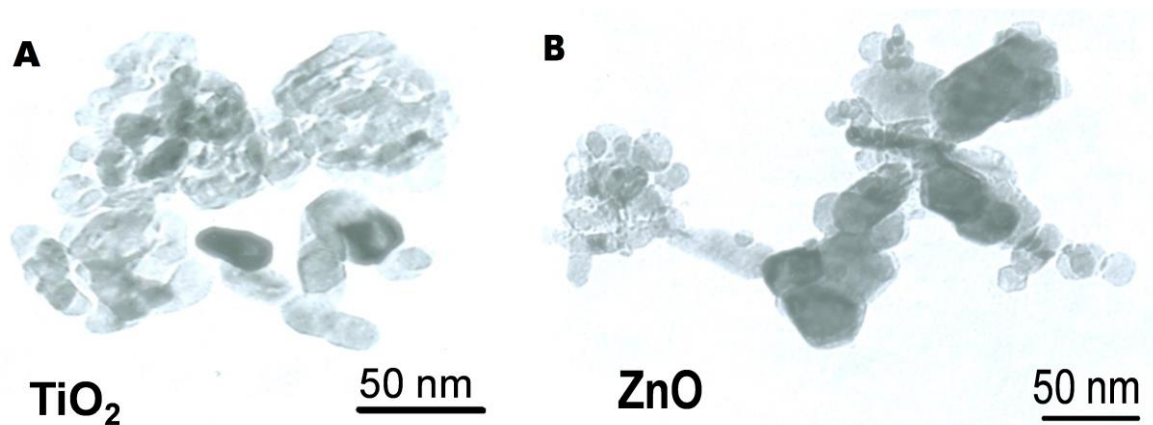


FIGURA 4 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos agregados de TiO_2 (A) e de ZnO (B).

Os resultados obtidos a partir do *Zetasizer* indicam que a suspensão estoque de TiO_2 apresenta um potencial zeta ζ de -19,2 mV e agregados com diâmetro variando entre 122,4 e 5560 nm. Destes, 55,5% possuem diâmetro inferior a 1000 nm (figura 5). Não sendo, portanto, encontradas partículas em escala “nano”.

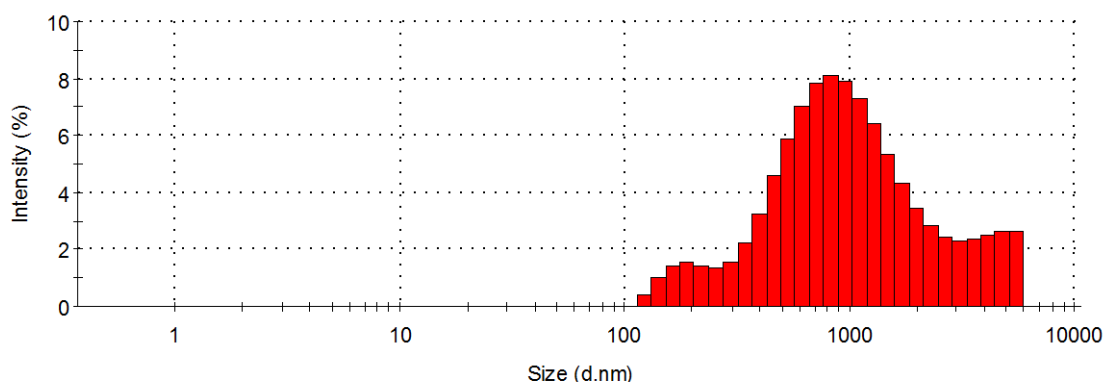


FIGURA 5 – Gráfico referente à distribuição de tamanho de nanopartículas de TiO_2 .

Já a suspensão de ZnO apresentou um potencial zeta ζ de 22,6 mV e agregados com diâmetro variando entre 68,6 e 5560 nm. Destes 1,2% estavam no tamanho nanoparticulado (<100 nm) e 88,2% possuem diâmetro entre 100 e 1000 nm (figura 6).

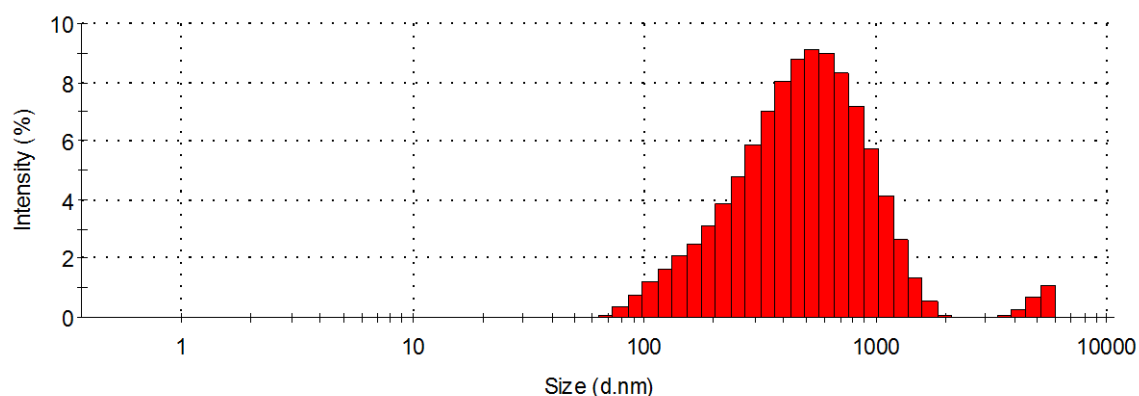


FIGURA 6 – Gráfico referente à distribuição do tamanho de nanopartículas de ZnO .

4.2. Taxa de mortalidade

Durante a exposição aguda, não ocorreu mortalidade em nenhum dos grupos expostos aos agregados de ZnO e TiO_2 . Por outro lado, altas taxas de mortalidade

foram observadas durante a exposição subcrônica às maiores concentrações de ZnO (Figura 7).

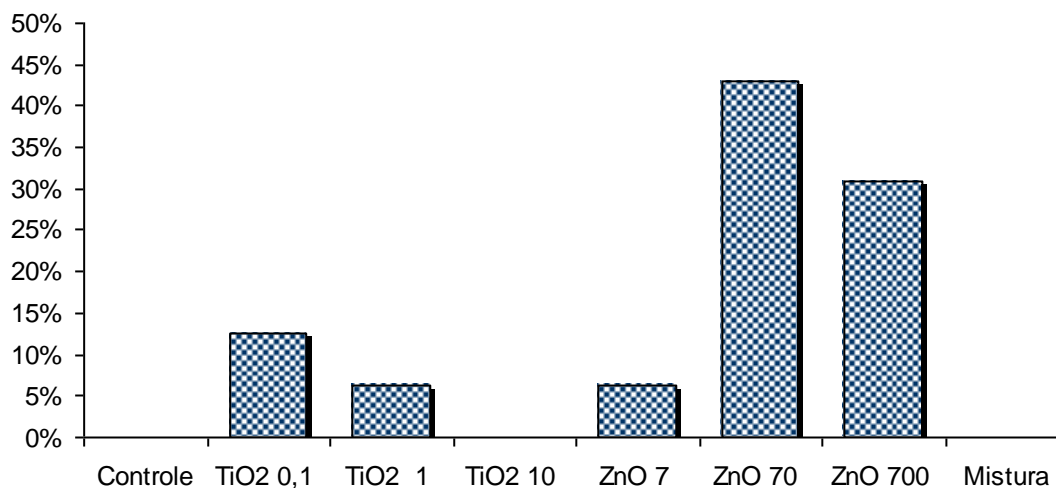


FIGURA 7 – Taxa de mortalidade (%) após a exposição subcrônica às nanopartículas de ZnO e TiO₂. Concentrações em µg/l

4.3. Atividade da Acetilcolinesterase

A atividade da AchE foi medida no músculo e no cérebro de *P. lineatus*. No músculo, uma redução significativa de 58,3% na atividade da AchE foi observada apenas os peixes expostos agudamente à maior concentração de TiO₂ em relação ao grupo controle (Figura 8). Após a exposição subcrônica, nenhum grupo apresentou alteração significativa da atividade da AchE (Figura 9).

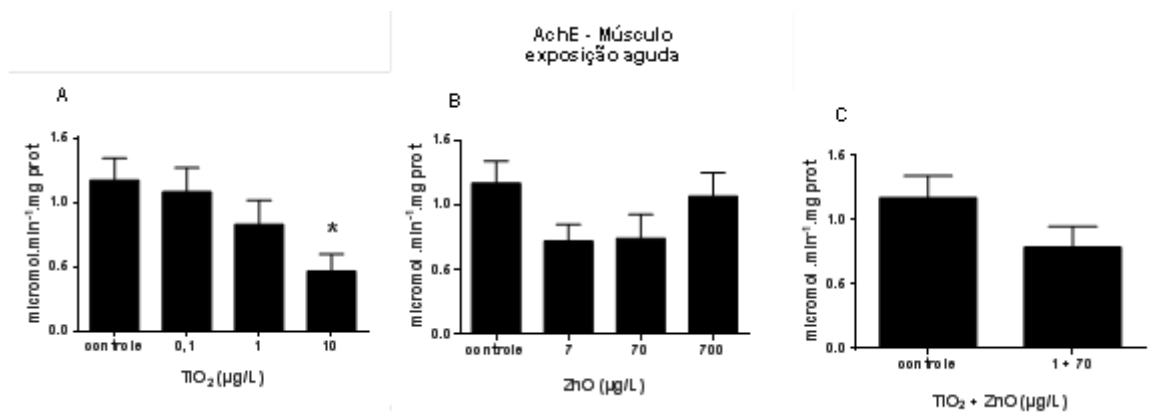


FIGURA 8 – AchE muscular de *P. lineatus* após a exposição aguda. Grupos exposto a (A) TiO₂, (B) ZnO e a (C) mistura destes dois contaminantes. Média ± erro padrão. * p<0,05.

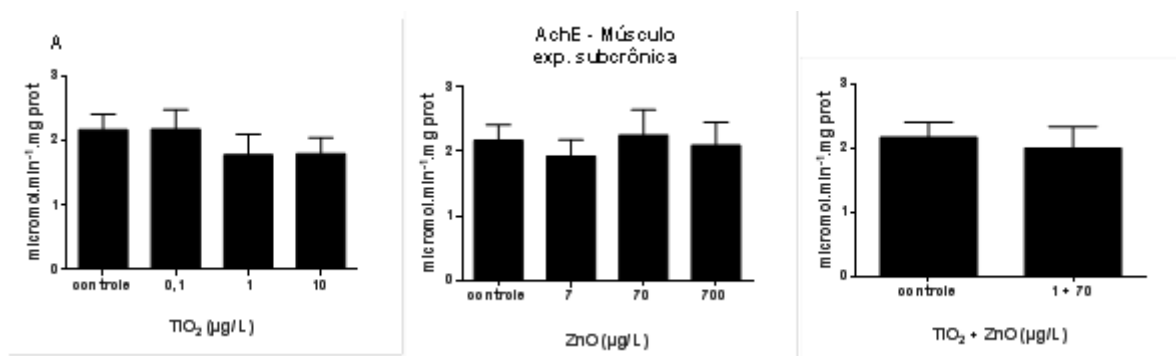


FIGURA 9 – AchE muscular de *P. lineatus* após a exposição subcrônica. Grupos exposto a (A) TiO₂, (B) ZnO e a (C) mistura destes dois contaminantes. Média ± erro padrão. * p<0,05.

No cérebro houve redução significativa da atividade da AchE de 29,5%, 38,1% e 28,4%, respectivamente, após a exposição aguda a 7 e 700 µg/l de ZnO e à mistura de TiO₂ e ZnO (Figura 10). Já a exposição subcrônica à mistura resultou em um aumento de 30,9 % na atividade desta enzima (Figura 11).

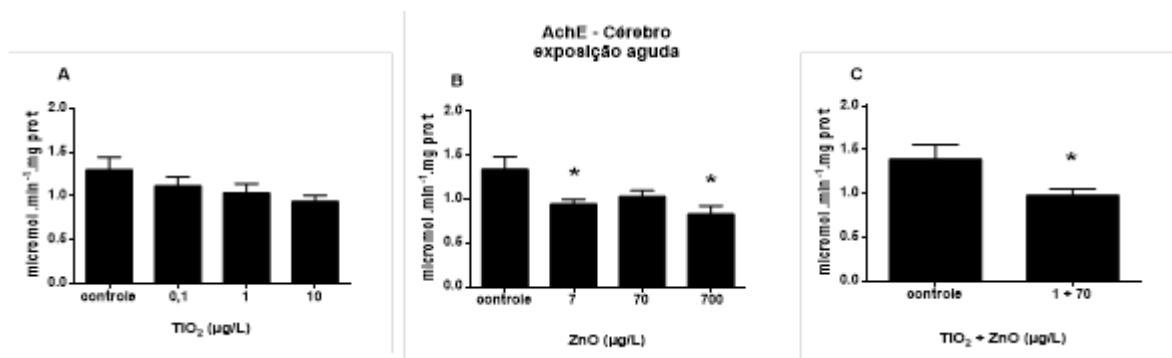


FIGURA 10 – AChE cerebral de *P. lineatus* após a exposição aguda. Grupos expostos a (A) TiO₂, (B) ZnO e a (C) mistura destes dois contaminantes. Média ± erro padrão. * p<0,05.

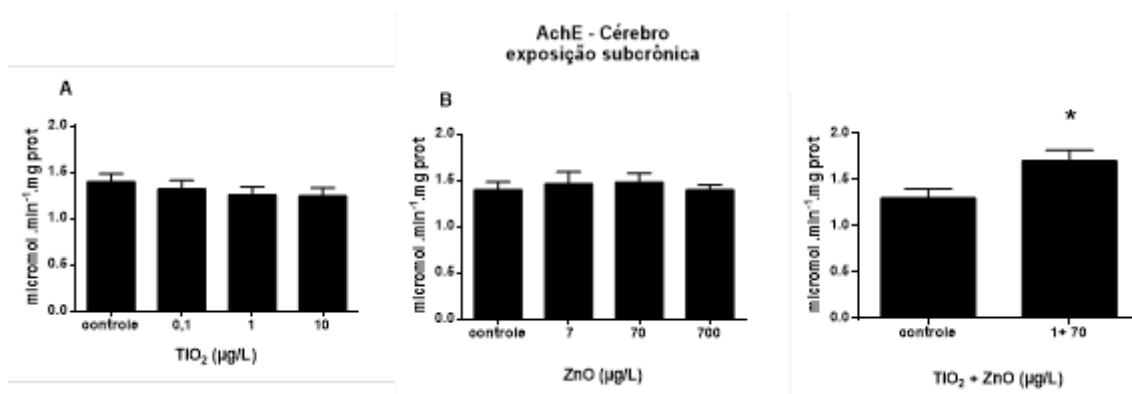


FIGURA 11 – AChE cerebral de *P. lineatus* durante a exposição subcrônica. Grupos expostos a (A) TiO₂, (B) ZnO e a (C) mistura destes dois contaminantes. Média ± erro padrão. * p<0,05.

4.4. Tióis não protéicos

Os níveis de tióis não protéicos (L-SH, *low molecular weight thiols*) foram medidos no fígado de *P. lineatus* após a exposição às nanopartículas. Não foi observada alteração dos níveis de L-SH nos grupos expostos agudamente às NPs individualmente, mas houve aumento de 48% de L-SH após exposição à mistura (Figura 12). Já a exposição subcrônica revelou uma redução de 45% de L-SH nos grupos de peixes expostos à 1 e 10 µg/l de TiO₂ (Figura 13).

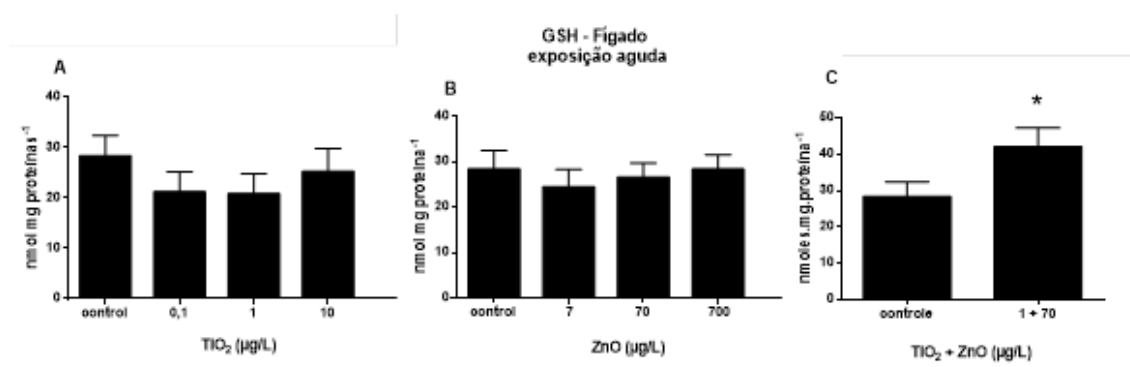


FIGURA 12 – conteúdo de Tióis não protéicos em fígado de *P. lineatus* após exposição. Grupos expostos a (A) TiO_2 , (B) ZnO e a (C) mistura destes dois contaminantes. Média \pm erro padrão. * $p < 0,05$.

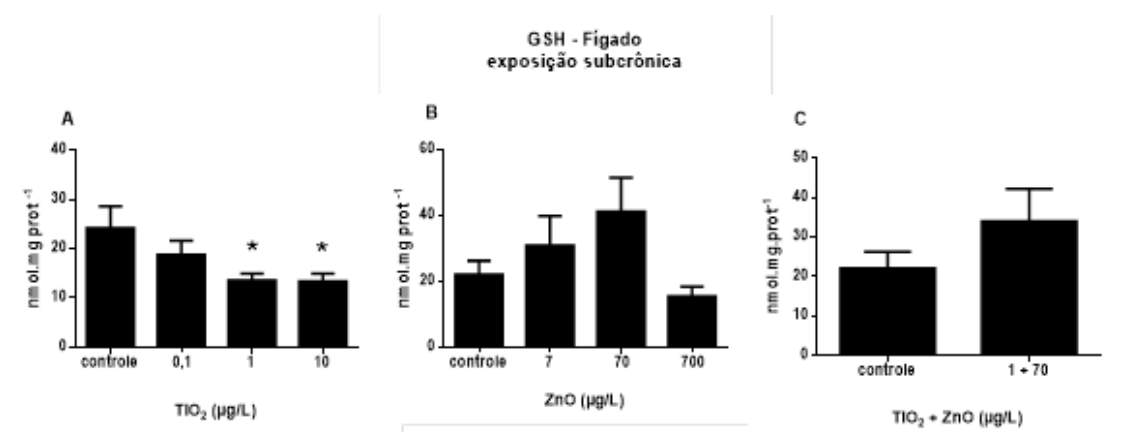


FIGURA 13 – conteúdo de GSH em fígado de *P. lineatus* após exposição aguda. Grupos expostos a (A) TiO_2 , (B) ZnO e a (C) mistura destes dois contaminantes. Média \pm erro padrão. * $p < 0,05$.

4.4. Peroxidação Lipídica

A peroxidação de lipídeos foi analisada nas amostras de fígado e brânquias. Não foi observada alteração nos níveis de hidroperóxidos no fígado de *P. lineatus* após a exposição aos agregados de nanopartículas em ambos os períodos de exposição (Figuras 14 e 15).

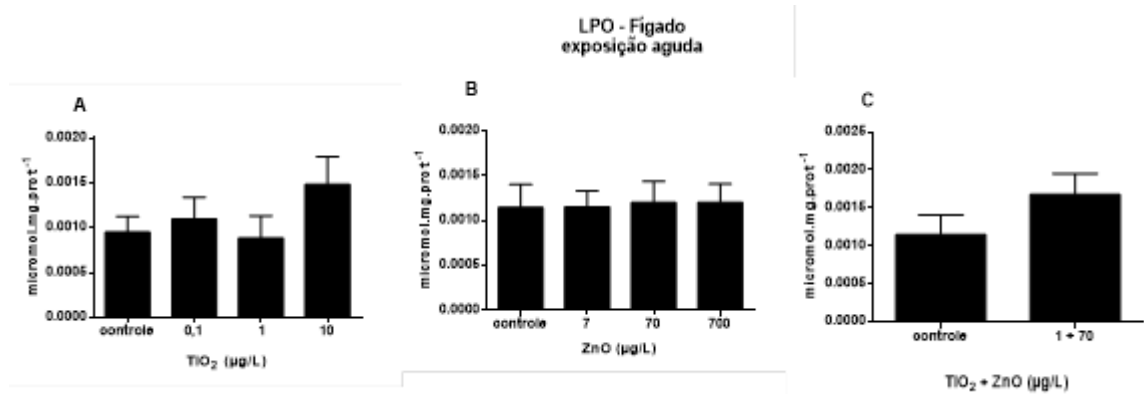


FIGURA 14 – LPO em fígado de *P. lineatus* após exposição aguda. Grupos expostos a (A) TiO_2 , (B) ZnO e a (C) mistura destes dois contaminantes. Média \pm erro padrão.

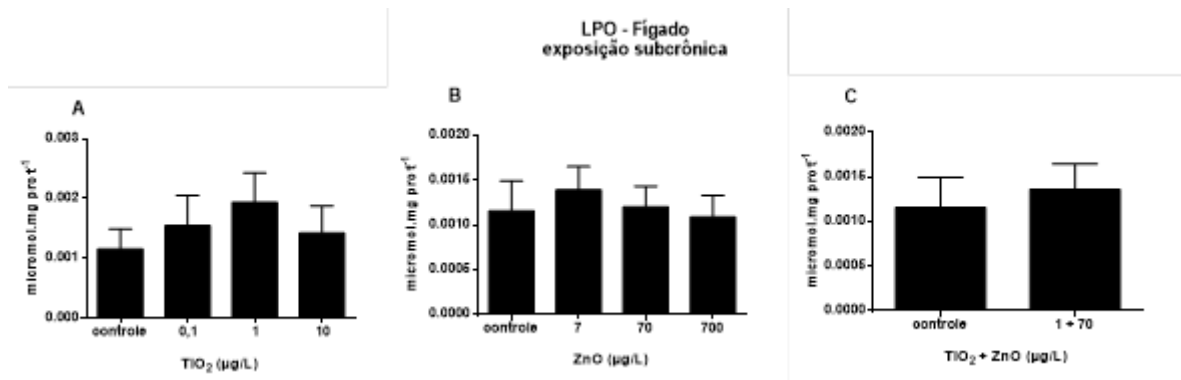


FIGURA 15 – LPO em fígado de *P. lineatus* após exposição subcrônica. Grupos expostos a (A) TiO_2 , (B) ZnO e a (C) mistura destes dois contaminantes. Média \pm erro padrão.

Por outro lado, houve redução de cerca de 40% da LPO nas brânquias dos peixes expostos ao TiO_2 agudamente em relação ao controle (figura 16), mas não após exposição subcrônica (figura 17).

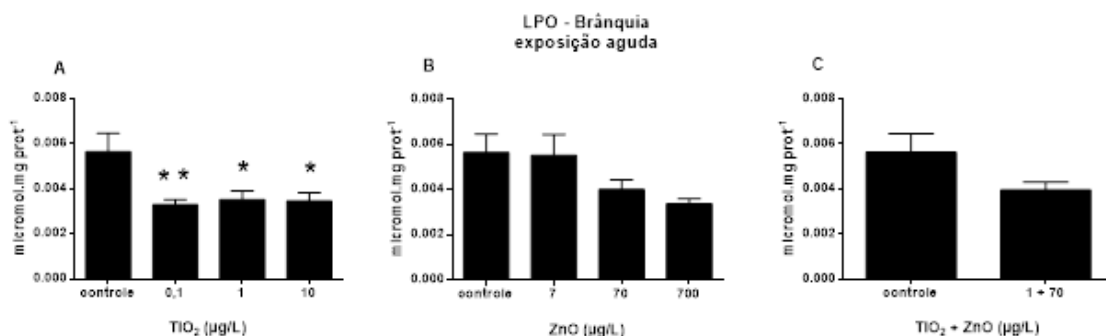


FIGURA 16 – LPO em brânquia de *P. lineatus* após exposição aguda. Grupos expostos a (A) TiO₂, (B) ZnO e a (C) mistura destes dois contaminantes. Media ± erro padrão. * p<0,05. **p<0,001

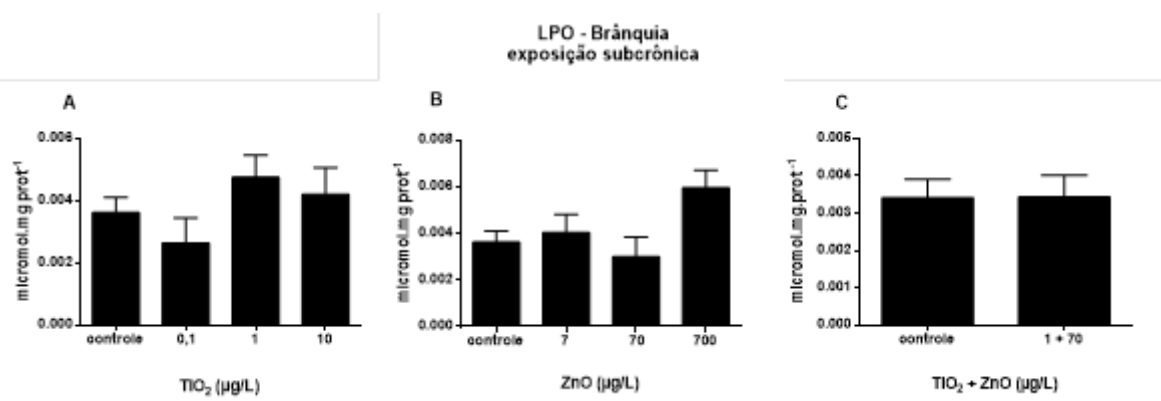


FIGURA 17 – LPO em brânquia de *P. lineatus* após exposição subcrônica. Grupos expostos a (A) TiO₂, (B) ZnO e a (C) mistura destes dois contaminantes. Media ± erro padrão.

4.5. Carbonilação de Proteínas

A carbonilação de proteínas foi medida no fígado e cérebro. No fígado, não foram observadas alterações após a exposição aguda (Figura 18). No entanto, após a exposição subcrônica, os peixes expostos à maior concentração de ZnO apresentaram valores de carbonilação protéica cerca de 220% maiores que o controle (Figura 19).

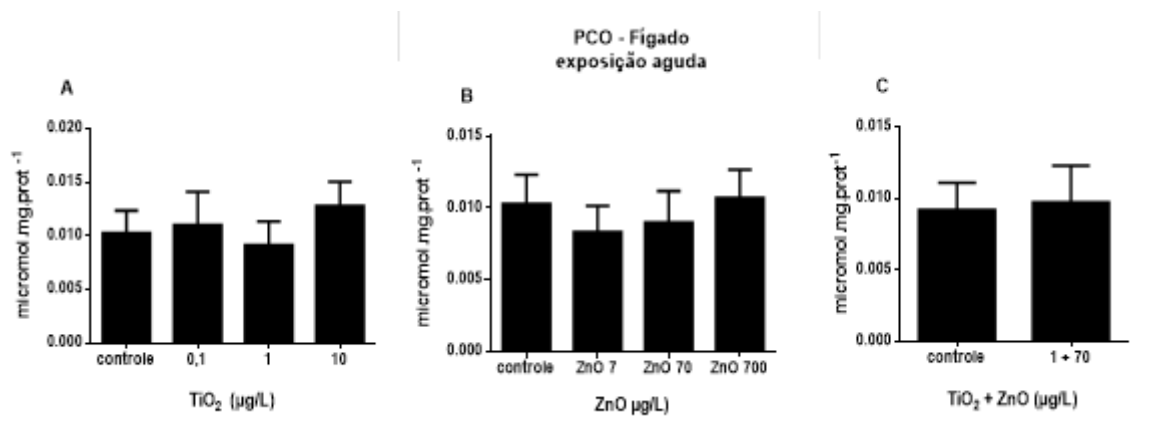


FIGURA 18 – PCO em fígado de *P. lineatus* após exposição aguda. Grupos expostos a (A) TiO₂, (B) ZnO e a (C) mistura destes dois contaminantes. Média ± erro padrão.

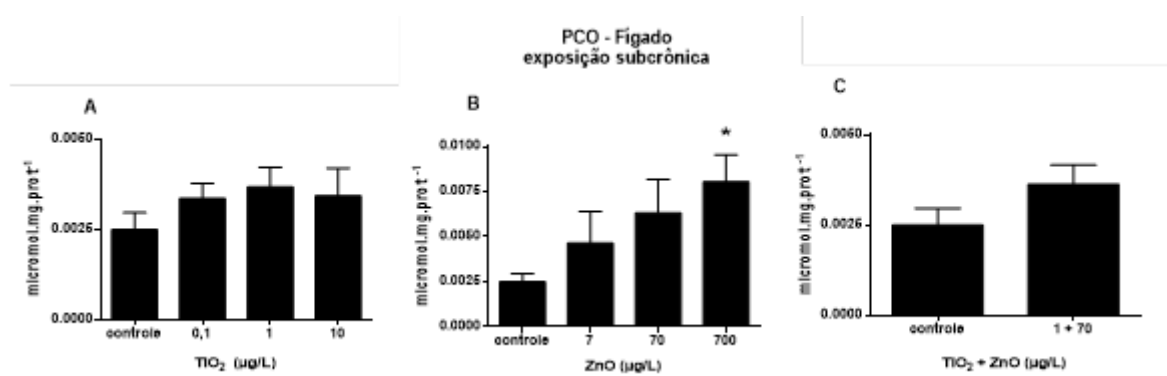


FIGURA 19 – PCO em fígado de *P. lineatus* após exposição subcrônica. Grupos expostos a (A) TiO₂, (B) ZnO e a (C) mistura destes dois contaminantes. Média ± erro padrão. * $p < 0,05$.

No cérebro, um aumento significativo de 54% nos níveis de carbonilação de proteínas foi observado apenas após a exposição aguda a 70 μg/l de ZnO (Figura 20). Após a exposição subcrônica, não foi observada alteração deste biomarcador (Figura 21).

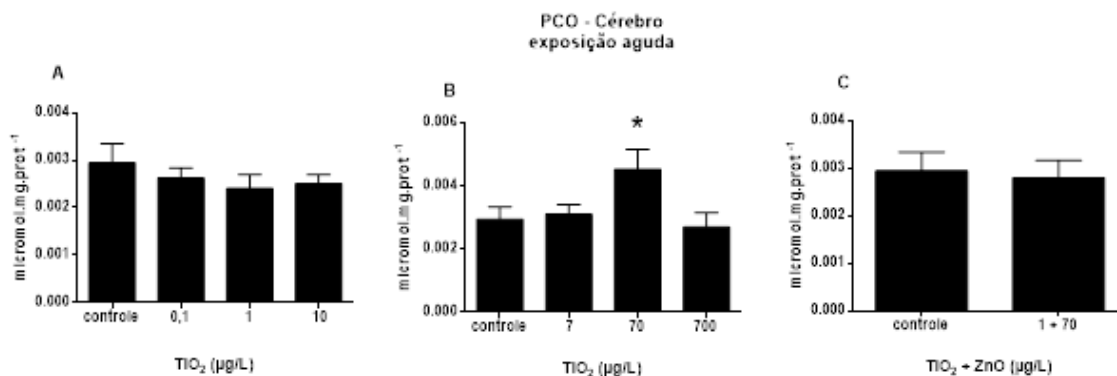


FIGURA 20 – PCO em cérebro de *P. lineatus* após exposição aguda. Grupos expostos a (A) TiO_2 , (B) ZnO e a (C) mistura destes dois contaminantes. Média \pm erro padrão. * $p < 0,05$.

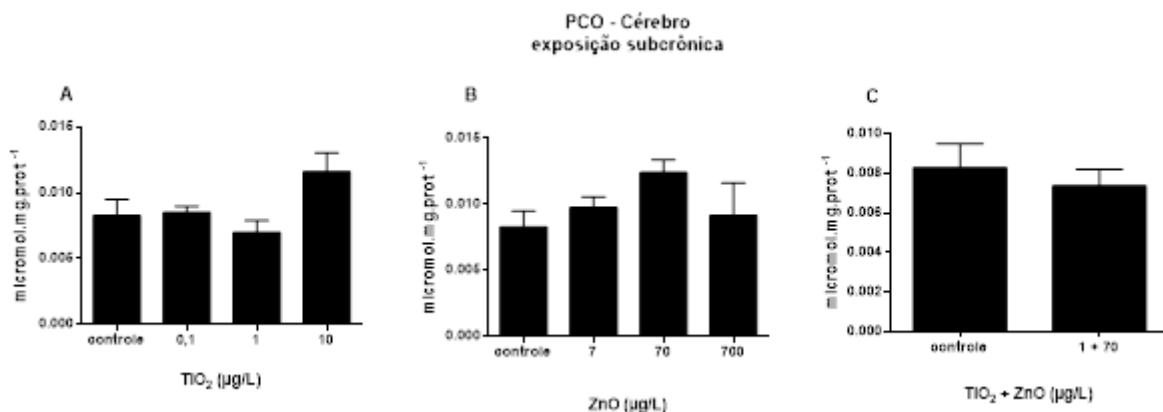


FIGURA 21 – PCO em cérebro de *P. lineatus* após exposição subcrônica. Grupos expostos a (A) TiO_2 , (B) ZnO e a (C) mistura destes dois contaminantes. Média \pm erro padrão.

Nas brânquias, foi observada aumento de 93% dos níveis de carbonilação de proteínas após a exposição aguda a 7 µg/l de ZnO (Figura 22). Após a exposição subcrônica, os grupos expostos a 70 µg/l de ZnO e à mistura apresentaram um aumento de 97% e 70%, respectivamente (Figura 23).

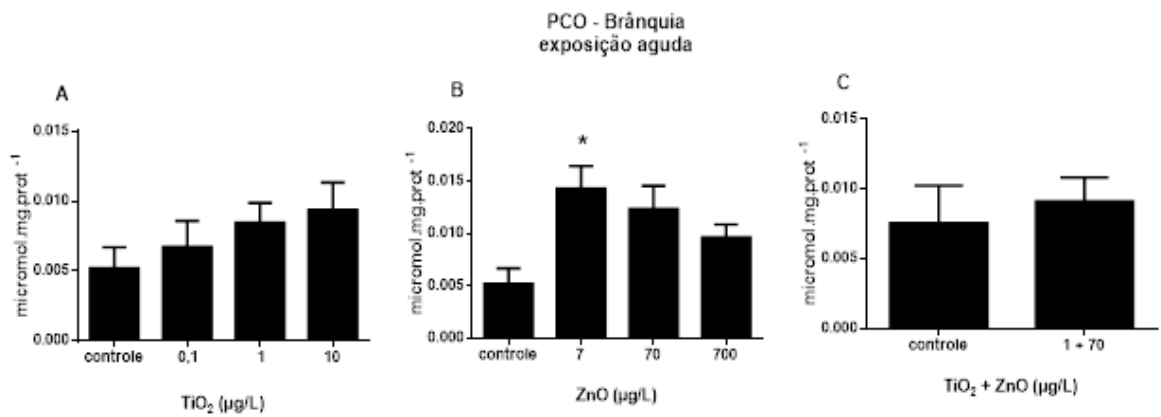


FIGURA 22 – PCO em brânquia de *P. lineatus* após exposição aguda. Grupos expostos a (A) TiO₂, (B) ZnO e a (C) mistura destes dois contaminantes. Media ± erro padrão. * p<0,05.

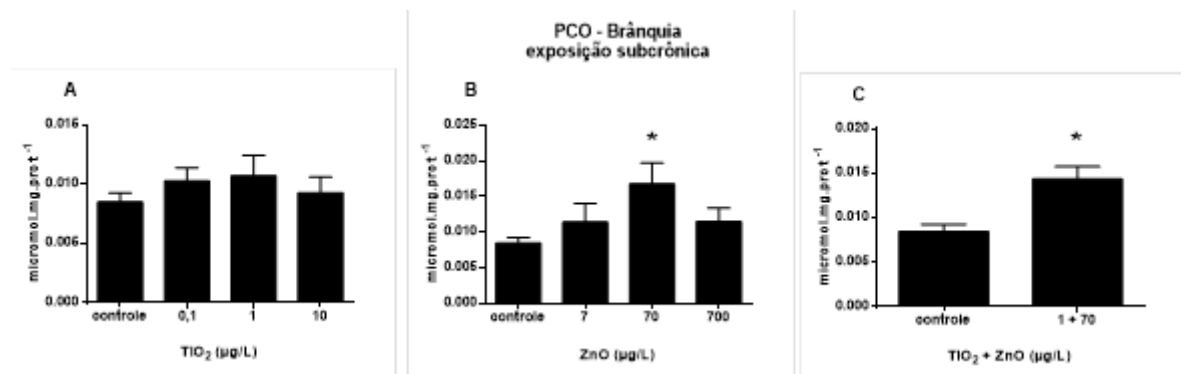


FIGURA 23 – PCO em brânquia de *P. lineatus* após exposição subcrônica a (A) TiO₂, (B) ZnO e a (C) mistura destes dois contaminantes. Concentrações em µg/l. Os resultados são expressos em media ± erro padrão. * p<0,05.

Todos os resultados das análises bioquímicas estão resumidos na tabela 3.

Tabela 3 – Resumo dos resultados das análises bioquímicas.

		Exposição Aguda	Exposição Subcrônica
Músculo	<i>AchE</i>	TiO ₂ 10 ↓	=
Cérebro	<i>AchE</i>	↓ZnO 7; ZnO 700; Mistura	Mistura ↑
	<i>PCO</i>	ZnO 70 ↑	=
Fígado	<i>GSH</i>	Mistura ↑	TiO ₂ 0, ↓; TiO ₂ 10
	<i>LPO</i>	=	=
	<i>PCO</i>	=	ZnO 700 ↑
Brânquia	<i>LPO</i>	↓TiO ₂ 0,1; TiO ₂ 1; TiO ₂ 10	=
	<i>PCO</i>	ZnO 7 ↑	ZnO 70 ↑; Mistura

4.6. Histopatologia

4.6.1. Microscopia de Luz

Os resultados da avaliação histopatológica das lesões encontradas no fígado, após as exposições aguda e subcrônica, estão representados nas tabelas 4 e 5, respectivamente. Na figura 24 podem ser observadas as imagens referentes às lesões encontradas e consideradas para a determinação do índice de alteração (Figuras 25 e 26). As alterações encontradas foram: necrose, colestase, infiltração leucocitária, foco basófilo e congestão. Essas lesões estavam presentes em todos os grupos e no controle, após os dois períodos de exposição (tabela 4 e 5). No entanto, o índice de lesão indicou diferença significativa entre o controle e os grupos após a exposição aguda à 0,1 µg/l de TiO₂ e 700 µg/l de ZnO e, após a exposição subcrônica à 700 µg/l de ZnO.

Após a exposição aguda, as principais lesões encontradas nos animais expostos à 0,1 µg/l de TiO₂ foram necrose (88,8%), infiltração leucocitária (44,4%) e congestão (22,2%) enquanto para os animais expostos à 700 µg/l de ZnO, as lesões encontradas em maior proporção foram necroses (100%), congestão (77,7%) e infiltração leucocitária (44,4%). Já após a exposição subcrônica, os animais expostos à 70 µg/l de ZnO apresentaram necrose (100%) e colestase (100%) e a ocorrência de resposta inflamatória foi representada pela infiltração leucocitária (42,8%).

Tabela 4 – Percentual de ocorrência de alterações histopatológicas no fígado de *P. lineatus* após exposição aguda. Concentrações em µg/l

Exposição aguda					
Grupos	Necrose	Congestão	Colestase	Infiltração leucocitária	Foco basófilo
Controle (n=7)	28,5	57,1	57,1	14,3	0
TiO ₂ 0,1 (n=9)	88,8	77,7	22,2	44,4	33,3
TiO ₂ 1 (n=8)	75	50	25	37,5	12,5
TiO ₂ 10 (n=9)	77,7	77,7	33,3	22,2	22,2
ZnO 7 (n=7)	85,7	28,5	42,8	57,1	0
ZnO 70 (n=7)	66,6	50	50	33,3	50
ZnO 700 (n=9)	100	77,7	0	44,4	11,1
Mistura (n=6)	83,3	33,3	33,3	0	33,3

Grupos experimentais com concentrações em µg/l. Valores de ocorrência em percentual (%).

Tabela 5 – Percentual de ocorrência de alterações histopatológicas no fígado de *P. lineatus* após exposição subcrônica. Concentrações em µg/l

Exposição subcrônica					
Grupos	Necrose	Congestão	Colestase	Infiltração leucocitária	Foco basófilo
Controle (n=10)	80	10	80	10	20
TiO ₂ 0,1 (n=5)	40	40	100	20	40
TiO ₂ 1 (n=9)	77,7	33,3	88,8	44,4	22,2
TiO ₂ 10 (n=6)	100	50	66,6	16,6	50
ZnO 7 (n=7)	85,7	42,8	71,4	28,5	28,5
ZnO 70 (n=7)	100	42,8	100	42,8	14,1
ZnO 700 (n=5)	100	0	100	0	0
Mistura (n=10)	70	30	90	30	30

Grupos experimentais com concentrações em µg/l. Valores de ocorrência em percentual (%).

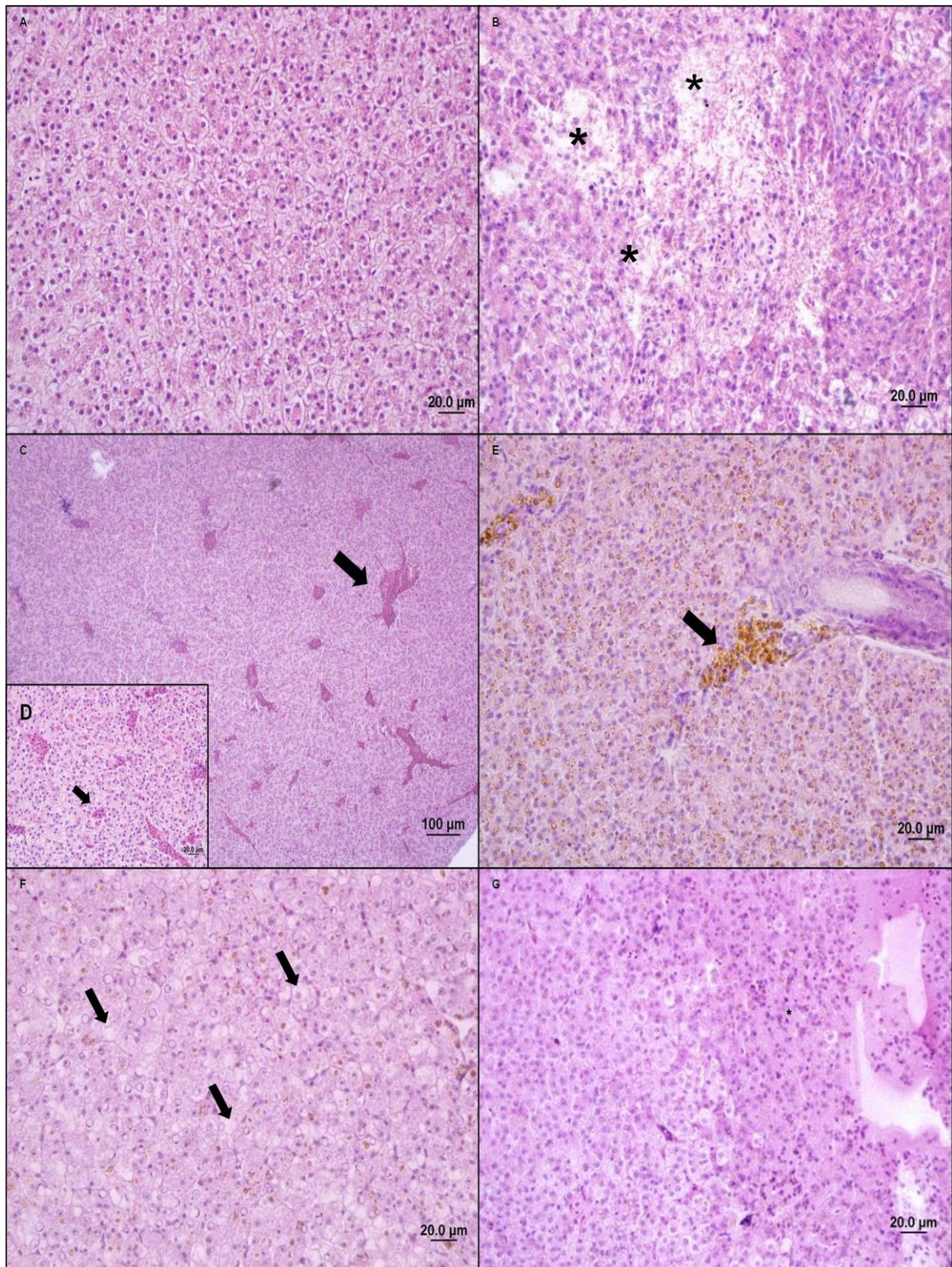


Figura 24 - Corte histológico do fígado de *P. lineatus* após exposição aguda e subcrônica ao ZnO e TiO_2 e à sua mistura. A – Tecido sem alteração (Exposição Subcrônica, controle). B – Área de necrose (Exposição aguda, TiO_2 0,1 $\mu\text{g/L}$). C – Congestão Vascular (Exposição Subcrônica, TiO_2 0,1 $\mu\text{g/L}$). D – Detalhe da congestão vascular (Exposição Subcrônica, TiO_2 0,1 $\mu\text{g/L}$). E – Tecido com colestase e presença de Centro de melanomacrófagos (seta preta) (Exposição Subcrônica, ZnO 70 $\mu\text{g/L}$ + TiO_2 0,1 $\mu\text{g/L}$). F – Degeneração Nuclear (Exposição Subcrônica, ZnO 70 $\mu\text{g/L}$). G – Foco basófilo (Exposição Subcrônica, ZnO 70 $\mu\text{g/L}$).

Após tabulação dos dados conforme as alterações presentes nas tabelas 2 e 3, um índice de alteração foi estabelecido (figuras 25 e 26). Esse índice revelou que aumento nos peixes expostos à menor concentração de TiO_2 e maior concentração de ZnO (figura 25) por período agudo, bem como no grupo exposto à 70 $\mu\text{g/l}$ de ZnO por período subcrônico (figura 26).

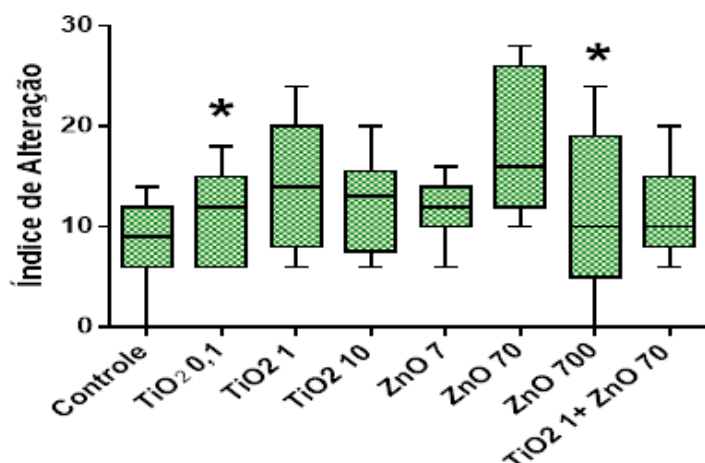


Figura 25 – índice de alteração do fígado de *P. lineatus* após exposição aguda às nanopartículas de TiO_2 , ZnO e mistura (em $\mu\text{g/l}$).

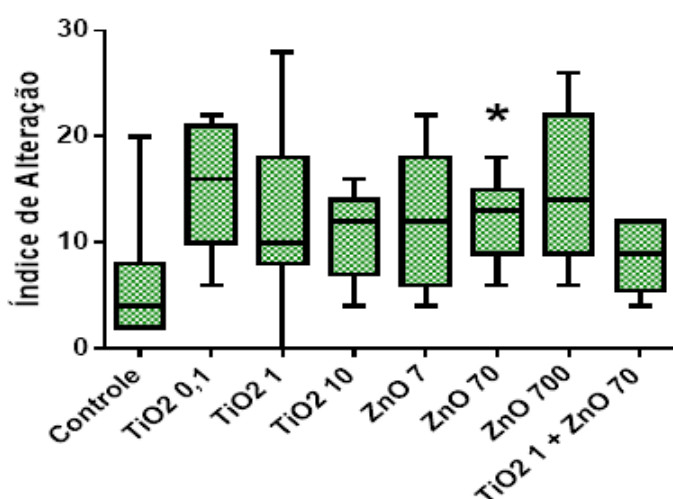


Figura 26 – índice de alteração do fígado de *P. lineatus* após exposição subcrônica às nanopartículas de TiO_2 , ZnO e mistura (em $\mu\text{g/l}$).

4.6.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Após os dois períodos de exposição, foram encontradas alterações nas lamelas primárias e secundárias em todos os grupos expostos às nanopartículas. Nos grupos controle, foram observadas algumas lesões, no entanto, em menor quantidade em relação aos grupos expostos.

Foi observada a ocorrência de hiperplasias na maioria das brânquias analisadas (figuras 27 e 28). Apenas no grupo exposto agudamente à mistura, foi observada a formação de aneurismas e fusão lamelar (figura 27). Da mesma forma, apenas após a exposição subcrônica foi observada a descamação do epitélio nos grupos expostos às maiores concentrações de ZnO (figura 28).

A presença de agregados de nanopartículas foi evidente após a exposição subcrônica aos dois tipos de nanopartículas. Nota-se que associados a esses agregados há ocorrência de descamação do epitélio branquial (Figura 29).

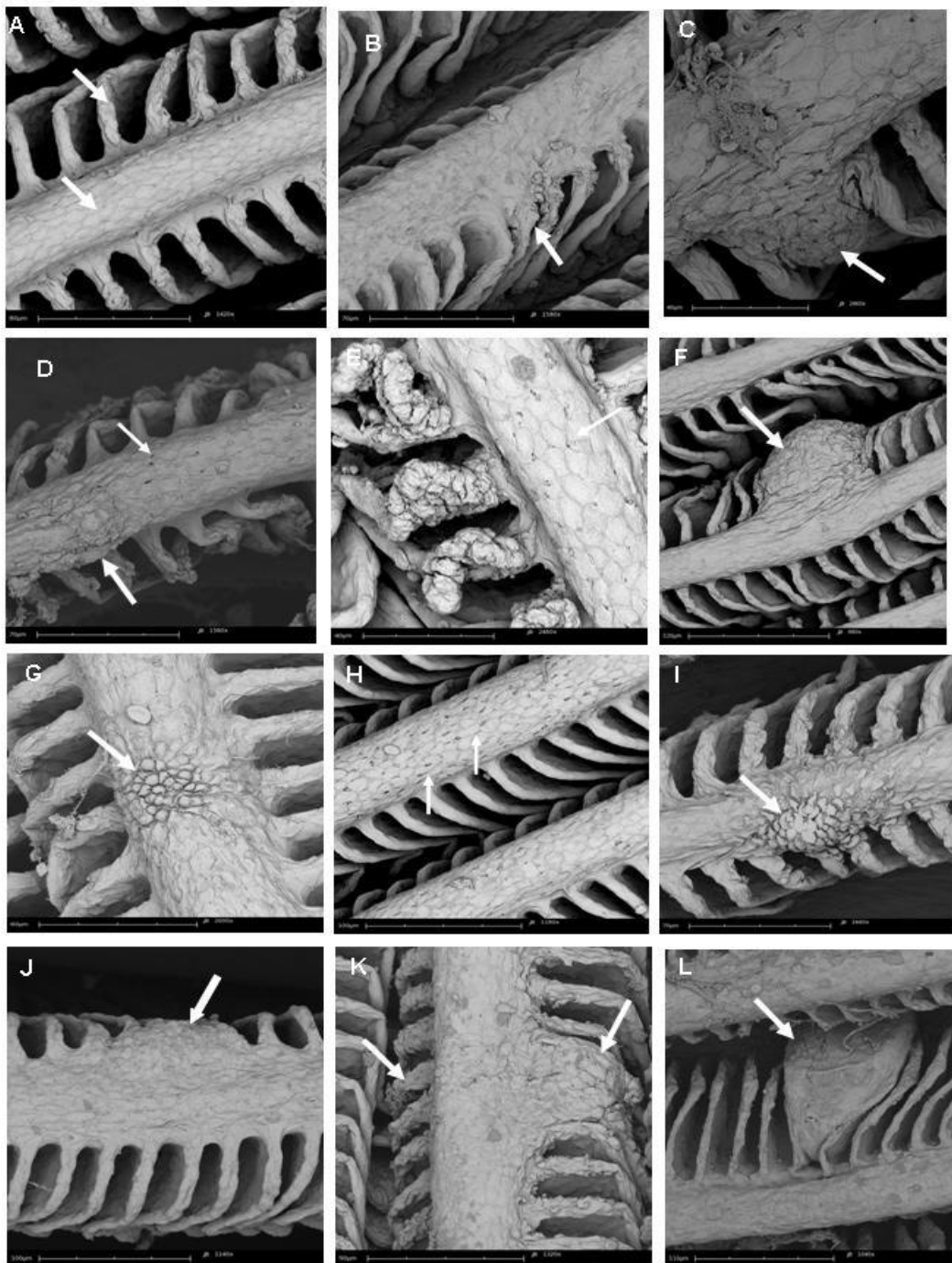


FIGURA 27 – Eletromicrografias das brânquias de *P. lineatus* após exposição aguda a diferentes concentrações de ZnO, TiO₂ e mistura destes. A- tecido sem alteração (controle). Setas indicam lamela primária e secundária. B- grupo exposto a 0,1 µg/L de TiO₂. Leve ocorrência de hiperplasia (seta). C e D – grupo exposto a 1 µg/L de TiO₂. Observa-se hipertrofia e a presença de células de cloro (setas). E – grupo exposto a 10 µg/L de TiO₂. Ocorrência de hiperplasia nas lamelas secundárias (setas). F – grupo exposto a 7 µg/L de ZnO. Fusão lamelar (seta). G e H – grupo exposto a 70 µg/L de ZnO. Grande incidência de hiperplasia na lamela primária e presença de células de cloro (setas). I e J – grupo exposto a 700 µg/L de ZnO. Grande incidência de hiperplasia e fusão lamelar (setas). K e L – grupo exposto a mistura de ZnO e TiO₂. Ocorrência de hiperplasias, fusão lamelar e aneurisma nas lamelas secundárias (setas).

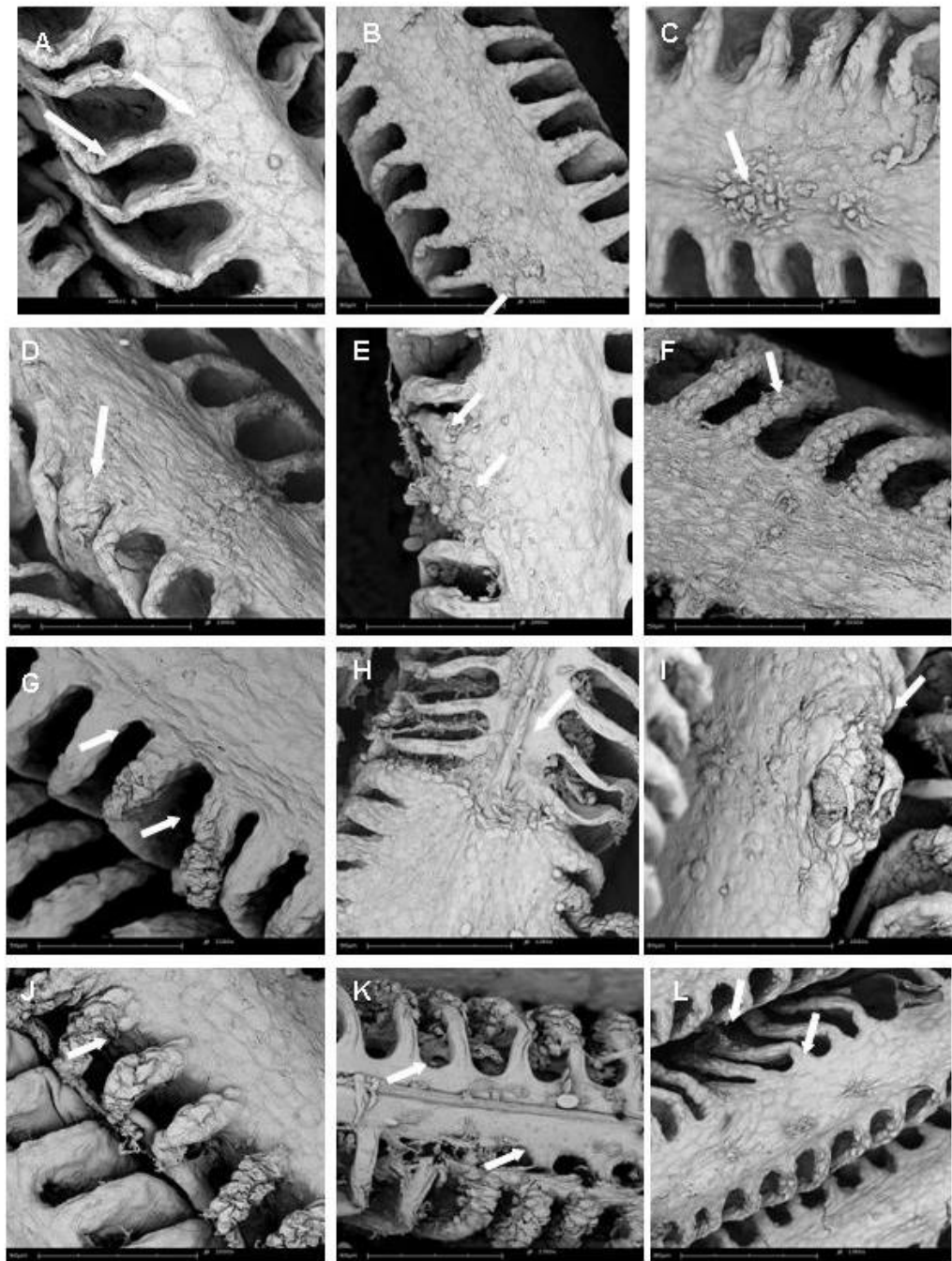


FIGURA 28 – Eletromicrografias das brânquias de *P. lineatus* após exposição subcrônica a diferentes concentrações de ZnO, TiO₂ e mistura destes. A- tecido sem alteração (controle). Setas indicam lamela primária e secundária. B- grupo exposto a 0,1 µg/L de TiO₂. Não foi observada a ocorrência de lesão. C e D – grupo exposto a 1 µg/L de TiO₂. Ocorrência de hiperplasia na lamela primária e hipertrofia (setas). E – grupo exposto a 10 µg/L de TiO₂. Ocorrência hiperplasia (setas). F – grupo exposto a 7 µg/L de ZnO. Hiperplasias nas lamela secundária (seta). G e H – tecido exposto a 70 µg/L de ZnO. Ocorrência de hiperplasia e descamação do epitélio (setas). I, J e K – grupo exposto a 700 µg/L de ZnO. Grande incidência de descamação do epitélio (setas). L – grupo exposto a mistura de ZnO e TiO₂. Ocorrência de hiperplasia (setas).

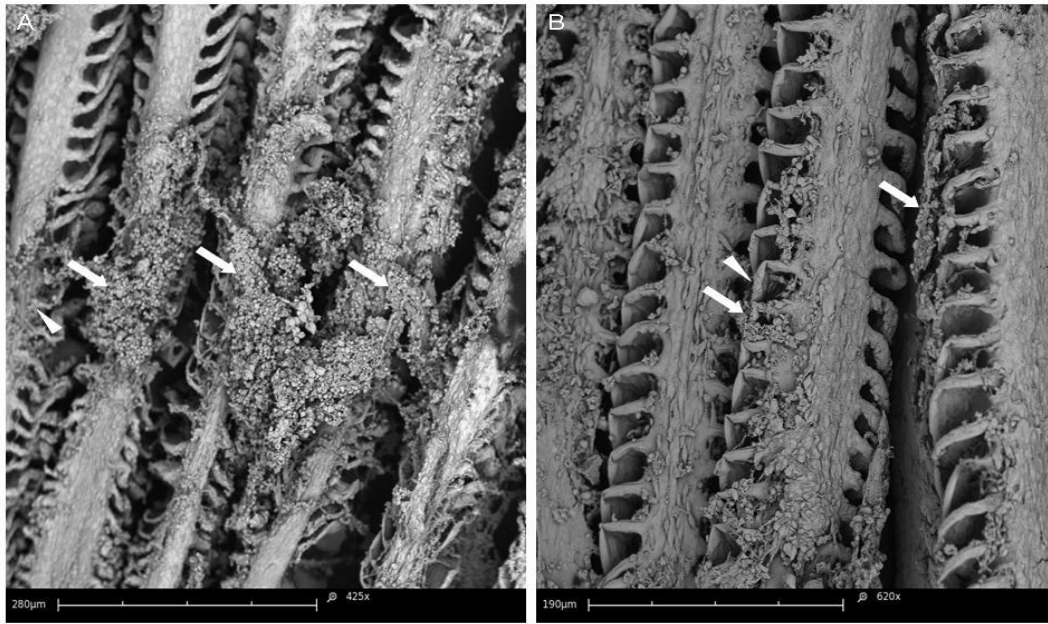


FIGURA 29 – Eletromicrografias de brânquias de *P. lineatus* após exposição subcrônica às nanopartículas. Nas fotos A e B observa-se a presença de agregados de ZnO (A) e TiO₂ (B) (setas) e descamação do epitélio (cabeças de seta).

5. DISCUSSÃO

O uso de nanopartículas tem aumentado muito nas últimas décadas, tanto no campo industrial como no científico e biomédico. Assim como o interesse nos potenciais benefícios que as nanopartículas podem trazer, aumenta também a preocupação com o seu potencial efeito tóxico, devido ao uso ou liberação no meio, que pode ser exemplificado pelo uso extensivo de nanopartículas de zinco (ZnO) e de titânio (TiO₂) em produtos como tintas, cosméticos, protetores solares, catalisadores, células solares, *chips* de computador, bactericidas, entre outras.

As nanopartículas podem atingir ambientes aquáticos naturais de diversas formas e, uma vez no ambiente tendem a formar grandes agregados que acabam sedimentando, mas que, no entanto, ainda estão biodisponíveis para animais bentônicos e filtradores (FARRÉ *et al.*, 2009)

São poucos os estudos com bioensaios que mostram os efeitos tóxicos de ZnO e TiO₂ livres ou formando agregados, sendo que grande parte utiliza concentrações extremamente altas e não realísticas destes óxidos. No entanto, estes estudos têm demonstrado a capacidade de nanopartículas e de seus agregados de provocarem estresse oxidativo, alterações histopatológicas, no desenvolvimento embrionário e altas taxas de mortalidade (FEDERICI *et al.*, 2007; HAO *et al.*, 2009; XIONG *et al.*, 2011; SHARMA *et al.*, 2012).

Caracterização das nanopartículas

A caracterização de qualquer substância a ser testada é imprescindível. No entanto, as nanopartículas requerem uma caracterização mais abrangente do que outros materiais, aos quais usualmente está limitada a determinação da estrutura química. O tamanho, forma, distribuição, carga elétrica de superfície, estado de aglomeração e taxa de dissolução afetam o modo de ação das nanopartículas. Assim, a caracterização apropriada permite uma melhor compreensão dos resultados.

Uma das características mais importantes e determinantes do modo de ação e da interação das nanopartículas com organismos vivos é o tamanho (DHAWAN *et al.*, 2010). Os resultados provenientes da caracterização das suspensões estoque

de ZnO e TiO₂ mostraram que ambas suspensões apresentam grandes agregados de nanopartículas. A formação destes agregados pode ser determinada pelo potencial ζ . Este é definido como a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a camada de fluído estacionária que fica aderida na partícula dispersa. O potencial ζ indica o grau de repulsão de partículas similarmente carregadas em uma dispersão. Desta forma, um alto valor de potencial ζ (acima de +30 mV ou abaixo de -30 mV) confere estabilidade às partículas, enquanto um valor baixo (entre -30 mV e +30 mV) indica que a atração excede a repulsão, resultando na tendência das partículas agregarem-se (HANAOR *et al.*, 2012; MALVERN®).

As suspensões estoque de ZnO e TiO₂ apresentaram valores baixos de potencial ζ , sendo, portanto, instáveis. Como já mencionado, fatores como presença de matéria orgânica (produtos de decomposição incompleta, material fecal e restos alimentares) também contribuem para o aumento da instabilidade e formação de agregados (MISRA *et al.*, 2012; ELAESSER *et al.*, 2012). Desta forma, acredita-se que durante os bioensaios, a concentração de agregados de ZnO e TiO₂ dispersos deva ter sofrido algumas variações, mesmo com a reposição diária de agregados e constante aeração, devido à sua complexação com a matéria orgânica e formação de agregados muito grandes que acabaram sedimentando. Porém, essas condições simulam o que ocorre no ambiente e, portanto, tem um significado muito importante do ponto de vista ecotoxicológico.

Mesmo com essas condições, os agregados de ZnO e TiO₂ foram capazes de provocar efeitos nocivos em *P. lineatus*. Assim, acreditamos que o material particulado tenha atingido o interior dos organismos através de duas rotas. A primeira rota envolveria fenestrações nas brânquias que dariam acesso à circulação sanguínea e, desta forma, aos outros órgãos. A segunda rota envolveria a ingestão de agregados. Como *P. lineatus* apresenta hábitos bentônicos, isto é, forrageia o substrato à procura de alimento, pode ter entrado em contato com os agregados que sedimentaram nos aquários ou que aderiram ao alimento. Contudo, não observamos nanopartículas no material (fígado e cérebro) analisado em MET (dados não mostrados), de modo que essas proposições são meramente especulativas até o momento.

Ambiente óxido-redutor de *P. lineatus*

Normalmente, a produção e degradação de espécies reativas de oxigênio na célula é um processo dinâmico e balanceado. No entanto, muitos poluentes são capazes de atingir o ambiente celular e produzir EROS, a partir de conversões metabólicas. Se esses não são eliminados prontamente, inicia-se um quadro de dano oxidativo (NEL, 2006).

No presente trabalho, as análises de concentração de tióis não protéicos, peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas foram selecionadas para avaliar alterações no ambiente oxido-redutor de diversos órgãos.

No fígado, os agregados de nanopartículas afetaram a concentração de tióis não protéicos, representados principalmente pela molécula de GSH, principal molécula antioxidante não enzimática celular. O conteúdo de L-SH diminuiu após a exposição subcrônica às maiores concentrações de TiO₂. Esse resultado indica um potencial tóxico do TiO₂ quanto à desregulação redox. Contudo, como a redução da concentração de L-SH foi acompanhada pela estabilidade de LPO e PCO, pressupõem-se que a ação dessas moléculas foi eficiente no combate de efeitos nocivos de espécies pró-oxidantes em lipídeos e proteínas que poderiam ter sido causados por TiO₂.

Por outro lado, o conteúdo de L-SH não se alterou após as exposições aguda e subcrônica aos agregados de ZnO. Mesmo assim, houve aumento da carbonilação de proteínas, indicando efeito direto, mais localizado ou por outro mecanismo (que não desregulação redox por redução da concentração de GSH) dos agregados de nanopartículas após a exposição subcrônica.

Com relação aos grupos expostos à mistura, foi observado um aumento na concentração de L-SH após a exposição aguda, fato não observado para as exposições individuais. Esse aumento demonstra o potencial de associações induzirem respostas biológicas/efeitos que não podem ser previstos a partir dos resultados provenientes de exposições a contaminantes individuais, e significa uma resposta de defesa do sistema antioxidante. Em células de mamíferos, a síntese de GSH é regulada negativamente pela presença de GSH (LAUTERBURG *et al.*, 1983). Desta forma, pressupõem-se que a redução inicial desta molécula, provocada pelo aumento de EROs, poderia estimular o aumento da sua síntese.

Alguns estudos *in vivo* com peixes demonstraram que ZnO e TiO₂ são capazes de causar carbonilação em proteínas. Em *P. lineatus*, a carbonilação de proteínas sofreu aumento após exposição ao ZnO (aguda no cérebro, subcrônica no fígado e a ambos os períodos de exposição nas brânquias). Nenhum órgão apresentou alteração da PCO após as exposições ao TiO₂, o que corrobora os dados de toxicidade relativa de ambos os óxidos metálicos, onde o ZnO mostra-se mais tóxico que o TiO₂ (ADAMS *et al*, 2006; HEINLAAN *et al*, 2008).

No cérebro, o aumento do parâmetro da PCO ocorreu apenas após a exposição aguda. A ausência de alteração da PCO após a exposição subcrônica indica um possível reajuste da capacidade antioxidante para lidar com o estresse ocasionado pelos agregados de nanopartículas. Em contrapartida, no fígado o aumento da PCO ocorreu apenas após a exposição subcrônica, o que sugere que sob o estresse de baixas concentrações e/ou em períodos menores de exposição, o sistema antioxidante do fígado conseguiu eliminar eficientemente as EROs, ou que o sistema de reparo ou degradação de proteínas foi eficiente a ponto de impedir o aumento dos níveis de PCO.

Nas brânquias, os níveis de PCO foram aumentados após os dois períodos de exposição aos agregados de ZnO. Esse resultado pode estar associado com o contato direto das brânquias aos agregados, independente destes terem sido capazes de entrar ou não nos organismos.

Não foi observado o aumento nos níveis de peroxidação lipídica nos órgãos analisados, o que sugere que o sistema de defesa antioxidante foi eficiente em prevenir esse tipo de lesão. Xiong *et al.* (2011) encontrou aumento nos níveis de LPO em *Danio rerio* (paulistinha) após exposição ao ZnO e TiO₂ por 96 h. No entanto, a concentração utilizada pelos autores foi muito superior a empregada no presente estudo (5 mg/l e 50 mg/l para ZnO e TiO₂, respectivamente) e do que o esperado para ambientes aquáticos. No presente estudo, observou-se a redução significativa da LPO nos grupos expostos ao TiO₂. Embora uma redução da LPO possa indicar, em princípio, uma “ação protetora”, é importante ressaltar que a peroxidação lipídica em baixos níveis é essencial para o funcionamento celular; a célula possui diversas lipoxigenases que induzem peroxidação lipídica. Com base na análise da histopatologia, não se acredita que o TiO₂ tenha desempenhado uma ação protetora nas brânquias de *P. lineatus*.

Atividade da Acetilcolinesterase

A análise da atividade da enzima acetilcolinesterase tem sido utilizada como biomarcador de efeito de exposição a pesticidas organofosforados e carbamatos além de metais pesados (STUM *et al.*, 2000).

Há evidências de que as nanopartículas podem, através da corrente sanguínea, atingir o sistema nervoso central, acumularem-se e causar danos (MEDINA *et al.*, 2007; HU e GAO, 2010). Por outro lado, nenhuma informação na literatura foi encontrada ao respeito do efeito ou presença de nanopartículas no músculo.

A partir dos resultados obtidos na análise da atividade da enzima acetilcolinesterase, foi observado que esta foi afetada no cérebro e músculo após os dois períodos de exposição. Contudo, a natureza da nanopartícula foi determinante do alvo; o ZnO afetou apenas o cérebro, enquanto que o TiO₂ afetou apenas o músculo. Esse dado é interessante, pois no cérebro a barreira hematoencefálica dificulta a entrada de contaminantes e as nanopartículas de Zn parecem estar tendo acesso a esse órgão primordial na sobrevivência de qualquer vertebrado.

Nano e micropartículas de prata, por exemplo, são capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica e se acumularem no cérebro de ratos, ocasionando degeneração neuronal e necrose, após 4 semanas de exposição (TANG *et al.*, 2008). Essa informação dá suporte à idéia de que os agregados de ZnO foram capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica, e desta forma causaram alterações no funcionamento da AchE cerebral. Após a exposição aguda, os agregados de ZnO e a mistura reduziram significativamente a atividade da AchE em relação ao controle, sendo que na mistura o efeito foi resultado da presença do ZnO e não de uma possível interação entre as duas nanopartículas.

Após o experimento subcrônico, atividade da AchE não se alterou frente ao ZnO, mas se observou um aumento de atividade na mistura, efeito esse inverso ao observado após a exposição aguda. Esses resultados podem estar relacionados com uma modulação da atividade da AchE após 30 dias de exposição. Em princípio, teria havido uma redução da atividade da AchE (constatado pelo experimento agudo) que foi reestabelecida e supercompensada (constatado pelo experimento subcrônico). Interessantemente, se isso de fato ocorreu, houve reestabelecimento

para a exposição ao ZnO e supercompensação apenas para a mistura, indicando novamente um efeito diferente da mistura em relação às exposições individuais.

A ausência de efeitos de TiO₂ no cérebro pode estar relacionada com o tamanho dos agregados, os quais apresentaram quase o dobro do diâmetro dos agregados de ZnO, demasiadamente grandes para entrar no tecido cerebral. Além disso, sabe-se que nanopartículas de ZnO podem sofrer dissolução (liberação de íons), o que pode ter implicações toxicológicas.

No tecido muscular, uma situação diferente foi observada. A atividade da AchE muscular foi afetada somente após a exposição aguda ao TiO₂. Assim, podemos classificar este tecido como um alvo preferencial na toxicidade de TiO₂ em *P. lineatus*, após exposição aguda.

Histopatologia

O índice de alteração que integra as lesões e alterações histopatológicas sofreu aumento nos peixes expostos a ZnO, de modo dependente da concentração e tempo de exposição, visto que a concentração de 700 µg/l afetou o fígado após exposição aguda, enquanto que o efeito de 70 µg/l foi subcrônico. Já existem relatos na literatura de que as nanopartículas de ZnO causam necrose hepática em ratos (SHARMA *et al.* 2012) e peixes (HAO *et al.* 2009), embora que em concentrações na ordem de centenas de miligramas por litro de água. No caso de *P. lineatus*, os efeitos mais comuns foram necrose, infiltração leucocitária, colestase e congestão.

A necrose é um tipo de lesão que pode ser irreversível para o tecido hepático caso ocorra frequentemente ou em áreas muito amplas, o que pode levar ao comprometimento parcial ou total do fígado. As consequências fisiológicas do mau funcionamento do fígado incluem problemas na secreção da bile, metabolismo de lipídeos e proteínas e na detoxificação. Esse tipo de lesão foi encontrada após os dois períodos de exposição.

As respostas inflamatórias, representadas principalmente pela infiltração leucocitária, a presença de colestase e congestão, também observadas após os dois períodos de exposições às NPs, estão relacionadas com o mecanismo da primeira linha de defesa dos organismos (MATSUSHIMA *et al.*, 2006), em resposta a agentes patológicos ou a morte celular, principalmente por necrose.

Alguns autores definiram dois tipos de lesões nas brânquias: o primeiro tipo de lesão resulta da resposta de defesa, o que inclui injúrias como hiperplasia e edema; o segundo tipo resulta da lesão em si, como a necrose e perda do epitélio (MU *et al.*, 2011). Neste trabalho, a hiperplasia foi a alteração predominante, encontrada em ambos os períodos de exposição, sendo, portanto, um mecanismo de defesa, dificultando o acesso de poluentes à corrente sanguínea, mas também, prejudicando a realização de trocas gasosas (GARCIA-SANTOS, 2007).

As fusões lamelares podem ocorrer como resultado da hiperplasia. Aneurismas foram encontrados após a exposição aguda, sugerindo a ocorrência de lesão na parede vascular das brânquias ou a interrupção do fluxo sanguíneo. Apenas após a exposição subcrônica à maior concentração de ZnO e à mistura observou-se a descamação do epitélio, que pode ter ocorrido como resultado de morte celular.

Esses resultados encontrados nas brânquias são consistentes com os encontrados por outros autores. Mu *et al.* (2011), por exemplo, encontrou lesões do primeiro tipo em brânquias de peixes expostos ao TiO₂, durante seis meses com concentrações variando de 1 a 7 mg/l. Hao *et al.* (2009) também encontrou lesões como hiperplasia e edema em peixes expostos a 100 e 200 mg/l de TiO₂, após 20 dias de exposição. Frederici *et al.* (2007) também encontrou aneurismas em trutas após 14 dias de exposição à 0,5 e 1 mg/l de TiO₂.

A análise das brânquias através da MEV também mostrou a presença de agregados de nanopartículas aderidos ao tecido. Assim, é esperado que as brânquias sejam afetadas, mesmo que apenas fisicamente, visto que a via de exposição foi principalmente hídrica. Contudo, os efeitos no fígado, causados por ZnO e TiO₂, dão suporte à idéia de absorção do material particulado através das brânquias ou da alimentação.

Acredita-se que as altas taxas de mortalidade ocorridas durante o experimento subcrônico, particularmente para o ZnO, sejam resultado, principalmente, das lesões e do acúmulo de agregados de nanopartículas nas brânquias o que pode ter dificultado, ou até mesmo impedido, a oxigenação apropriada dos peixes.

Análise conjunta dos Biomarcadores

De forma geral, os dados existentes à respeito da toxicidade de nanomaterias variam consideravelmente. Isso se deve às diferenças de sensibilidade entre as espécies utilizadas em ensaios com nanopartículas e diferenças das características intrínsecas das partículas. Além disso, outros fatores físicos devem ser considerados, pois alteram a biodisponibilidade destes materiais e dificultam a interpretação dos resultados. Como já mencionado, fatores abióticos como salinidade, pH, temperatura, presença de íons e ligantes orgânicos podem alterar a toxicidade e biodisponibilidade das nanopartículas no ambiente natural.

Esses fatores foram controlados na medida do possível durante os bioensaios com ZnO e TiO₂. No entanto, é bastante provável que, mesmo com a troca parcial diária da água, restos de alimento e material fecal tenham permanecido nos aquários e estes tenham adsorvido nanopartículas, diminuindo consideravelmente a biodisponibilidade de ZnO e TiO₂. Mesmo assim, os resultados obtidos permitem afirmar que as nanopartículas de ZnO e TiO₂ não são inócuas aos peixes expostos, sendo capazes de induzir efeitos nocivos em órgãos como fígado, cérebro e músculo.

Os biomarcadores utilizados foram eficientes em determinar a toxicidade dos agregados de ZnO e TiO₂, indicando que estes podem gerar um quadro de estresse oxidativo em diversos órgãos, devido a ocorrência em danos em proteínas (em resposta ao ZnO) ou ativação do sistema antioxidante (no fígado, em resposta ao TiO₂). Os resultados também indicaram o potencial neurotóxico desses materiais e seus órgãos-alvo. As análises histopatológicas do fígado dão suporte à idéia de absorção dos agregados enquanto as análises da estrutura das brânquias, após as exposições, permitem supor que as nanopartículas podem ter efeitos tóxicos, e até mesmo letais, sem entrar no organismo.

Os resultados deste trabalho se aproximam muito ao esperado que ocorra no ambiente tendo, portanto, tanto implicações para bioensaios em laboratório bem como para exposições ambientais.

6. CONCLUSÕES

- A caracterização das nanopartículas de ZnO e TiO₂ mostrou que em meio aquoso esses nanometais tendem a formar agregados instáveis, que podem vir a sedimentar, mas que no entanto, ainda podem afetar os peixes;
- Os agregados de ZnO e, em menor grau de TiO₂, foram capazes de provocar efeitos letais em *P. lineatus* durante a exposição subcrônica, em concentração baixas e ambientalmente relevantes;
- A ocorrência de alterações no ambiente oxidorreduzidor foi observada em todos os órgãos analisados (fígado, cérebro e brânquias) após os dois períodos de exposição aos animais expostos ao ZnO;
- Agregados de ZnO apresentaram potencial neurotóxico, uma vez que causaram redução da atividade da enzima acetilcolinesterase no cérebro de *P. lineatus*, após os dois períodos de exposição, enquanto que no músculo essa atividade sofreu redução apenas por TiO₂;
- As misturas induziram respostas que foram diferentes das observadas para os agregados individuais no cérebro e no fígado;
- As alterações histopatológicas encontradas no fígado dão suporte à idéia da absorção do material particulado, que atingiria a corrente sanguínea através das brânquias ou da alimentação;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACWORTH; BAILEY, 1995 *In*: RODRIGUES, L. C. Estudo das glutathione s-transferases hepáticas solúveis do peixe *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Pacu). **Tese de doutorado em Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes/UERJ**, Brasil, 2003.
- ADAMS, L.K.; LYON, D.Y.; MCINTOSH, A.; ALVAREZ, P.J.J. Comparative toxicity of nano-scale TiO₂, SiO₂ and ZnO water suspensions. **Water. Sci. Technol.**, v. 54, p.327–334, 2006.
- AITKEN, R., CHAUDHRY, M., BOXALL, A., HULL, M. Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. **Occup. Med.** v. 56, p. 300 – 306, 2006.
- ARORA, S., RAJWADE, J. M., PAKNIKAR, K. M. Nanotoxicology and in vitro studies : The need of the hour. **Toxicol. and App. Pharm.** V. 258, p. 151-165, 2012.
- ARTELT, S.; CREUTZENBERG, O.; KOCK, H.; LEVSEN, K.; NACHTIGALL, D.; HEINRICH, U.; RUHLE, T.; SCHLOGL, R. Bioavailability of fine dispersed platinum as emitted from automotive catalytic converters: a model study. **Sci. Total. Environ.**, v.228, p.219–242, 1999.
- ARUFE, M.I.; ARELANO, J.M.; GARCÍA, L.; ALBEDIN, G.; SARASQUETE, C. Cholinesterase activity in gilthead seabream (*sparus aurata*) larvae: characterization and sensitivity to organophosphosphate azinphosmethyl. **Aquat. Toxicol.**, v. 84, p. 328-336, 2007.
- BAUN, A.; HARTMANN, N.B.; GRIEGER, K.; KUSK, K.O. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. **Ecotoxicol.**, v. 17, p. 387–395, 2008.
- BAVEYE, P., LABA, M. Aggregation and toxicology of titanium dioxide nanoparticles. **Environ, Health. Perspect.** V. 116, p. 152-156. 2008.
- BERNET, D., SCHMIDT, H., MELER, W., BURKHARDT-HOLM, P., WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases.** v. 22, p. 25-34, 1999.
- BEYER, J. Fish biomarkers in marine pollution monitoring: evaluation and validation in laboratory and field studies. Tese academica, Universidade de Bergen, Noruega. 1996.
- BOUSKILL, N.J.; HANDY, R.; FORD, T.E.; GALLOWAY, T.S. Differentiating copper and arsenic toxicity using biochemical biomarkers in *Asellus aquaticus* and *Dreissena polymorpha*. **Ecology and Environ. Saf.**, v.65, p. 342-349, 2006.
- BRADFORD, M.A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal of Biochem.** V. 72, p. 248-254. 1976.
- CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.21, p.61–69, 2006.
- COMMANDEUR, J.N.M.; STIJNTJES, G.J.; VERMEULEN, N.P.E. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. **Pharmacol.**, Rev. 47, 271/ 330, 1995.
- CURTIS, J., GREENBERG, N., PHILLIPIS, S., KRIEGER, G. Nanotechnology and nanotoxicology: a primer for clinicians. **Toxicol. Sci.** v. 25, p. 245-260, 2006.

- DANIEL, M., ASTRUC, D. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **J. Chem. Info.**, v.35, p.16, 2004.
- DAWSON, N. G., Sweating the small stuff: environmental risk and nanotechnology. *Bioscience*. v. 58, p. 690, 2008.
- DHAWAN, A.; SHARMA, V. Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 398, p. 589-605, 2010
- DONALDSON, K., STONE, V., TRAN, C. L., KREYLING, W., BORM, P.J. Nanotoxicology, **Occup. Environ. Med.** v. 61, p.727-728, 2004.
- DELLINGER B, PRYOR WA, CUETO R, SQUADRITO GL, HEDGE V, DEUTSCH WA. The role of combustion-generated radicals in the toxicity of PM 2.5. **Proc Combust Inst**, v.28, p.2675–2681, 2000.
- DUNFORD, R.; SALINARO, A.; CAI, L.; SERPONE, N.; HORIKOSHI, S.; HIDAKA, H.; KNOWLAND, J. Chemical oxidation and DNA damage catalyzed by inorganic sunscreen ingredients. **Toxicol Lett**, v.80, p.61–67, 1995
- ELSAESSER, A.; HOWARD, C. **Toxicol. nano.** v. 64, p. 129-137, 2012
- EPA, 2007. Nanotechnology White Paper. US Environmental Protection Agency Report EPA 100/B-07/001, Washington. Disponível em: <http://www.epa.gov/>.
- FARRÉ, M.; GAJGA-SHARANTZ, K.; KANTIANI, L.; BARCELÓ, D. Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 393, p. 81-95, 2009.
- FEDERICI, G.; SHAW, B.J.; HANDY, R.D.; Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aqua. Toxicol.**, v, 84, p. 415–430, 2007.
- FIGUEROLA, A.; CORATO, R; MANNA, L; PELLEGRINO, T. From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. **Pharm. Reas.** v. 62, p.126-146, 2010.
- GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S.M.; CARROLA, J.; ONTAINHASFERNANDES,A. Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 59, n. 2, p. 376-381. 2007.
- GRAINGER, D.W.; CASTNER, D.G. Nanobiomaterials and nanoanalysis: opportunities for improving the science to benefit biomedical technologies. **Adv. Mater.**, v.20, p.867–877, 2008.
- GRIVICICH, I., PETERS G,J., SCHWARTSMANN G. Sequence-dependent Growth Inhibition and DNA Damage Formation by the Irinotecan±5-Fluorouracil Combination in Human Colon Carcinoma Cell Lines. **Eur. J. Can.**, v.35, p.1851-1861, 1999.
- GURR, J.R.; WANG, A.S., CHEN, C.H.; JAN, K.Y. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. **Toxicol.**, v.213, p.66–73, 2005.
- HANDY, R.D.; HENRY, T.B.; SCOWN, T.M.; JOHNSTON, B.D.; TYLER, C.R. Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish — a mechanistic analysis. **Ecotoxicol.**, v. 17, p. 396–409, 2008.
- HANAOR, D.; MICHELAZZI, M.; LEONELLI, C.; SORRELL, C. C. The effects of carboxylic acids on aqueous dispersion and eletroforetic deposition of ZrO₂. **J. Eu. Cer. Soc.** v. 32, p. 235-244, 2012.
- HAO, L.; WANG, Z., XING, B. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). **J. Environ. Sci.**, v. 21, p. 1459-1466, 2009.

- HEINLAAN, M.; IVASK, A.; BLINOVA, I.; DUBOURGUIER, H. C.; KAHRU, A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*. v. 71, p. 1308-1316, 2008.
- HU, Y. L.; GAO, J. Q. Potencial neurotoxicity of nanoparticles. *Int. J. Pharm.* v. 394, p. 115-121, 2010.
- HUANG, Z.; ZHENG, X.; YAN, D.; YIN, G.; LIAO, X.; KANG, Y.; YAO, Y.; HUANG, D.; Hao, B. Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria. *Langmuir*, v.24, p.4140–4144, 2008.
- JIANG, Z.Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.*, v.202, p.384-389, 1992.
- JIANG, Z.Y.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*, v.26, p.853-856, 1991.
- KAEGI, R.; ULRICH, A.; SINNET, B.; VONBANK, R.; WICHSER, A.; ZULEEG, S.; SIMMLER, H.; BRUNNER, S.; VONMONT, H.; BURKHARDT, M.; BOLLER, M. Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environ. Poll.*, v. 156, p.233–239, 2008.
- KOPECKA, J.; PEMPKOWIK, J.; Temporal and spacial variations of selective biomarker activities in flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Baltic proper. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* v. 70, p. 379-391, 2008.
- LAUTERBURG, B. H., SMITH, C. V., HUGHES, H., MITCHELL, J. R. Determinants of hepatic glutathione turn over: toxicological significance. Em: Lambie, J. W. (Ed), Drug metabolism and distribution. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, Netherlands, p. 166-180, 1983.
- LEVINE, R.L.; WILLIAMS, J.A.; STADTMAN, E.P.; SCHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Meth. Enzimol.* v, 233, p. 246-257, 1994.
- Li, H.; ZHANG, J.; WANG, T.; LUO, W.; ZHOU, Q.; JIANG, G. Elemental selenium particles at nano-size (Nano-Se) are more toxic to Medaka (*Oryzias latipes*) as a consequence of hyper-accumulation of selenium: a comparison with sodium selenite. *Aquat. Toxicol.*, v. 89, p.251–256, 2008.
- LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* V. 37, p. 294-303. 2001
- LUX REPORT. Nanomaterials state of the market: stealth success, broad impact. Disponível em: <http://portal.luxresearchinc.com/research/document/3735>, 2008.
- LYNCH, I., DAWSON, K. A., LINSE, S. Detecting cryptic epitopes created by nanoparticles. *Sci. Stke.* p. 14, 2006.
- MACH, R. Nanoscale treatment of groundwater. Federal remedial technology roundtable: naval facilities engineering command. Disponível em: http://www.frtr.gov/pdf/meetings/l-mach_09jun04.pdf, 2004.
- MACHADO, M.R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. *Unopar Científica*. v. 1, n. 1, p. 63-76. 1999
- MAYNARD, A.D. Nanotechnology: A Research Strategy for Addressing Risk. Woodrow Wilson International Center for Scholars, Washington, DC, 2006.
- MATUSHIMA E.R., FILHO, L., KANAMURA, A., TAKAMI, C. SINHORINI, I.L. Experimental chronic granulomatous inflammatory process in fish: a morphological, ultrastructural and immunocytochemical study. *Braz. J. Vet. Res. Anim.* v. 43(2), p.152-158, 2006.

- MCCARTY, J. F., SHUGART, L. R. Biological markers of environmental contamination. **Mccarty, J. F., Shugart, L. R. Biological markers of environmental contamination.** Lewis Publisher, Boca Raton, FL, USA. p. 3-16, 1990.
- MEDINA, C.; SANTOS-MARTINEZ, M.J.; RADOMSKI, A.; CORRIGAN, O.I.; RADOMSKI, M.W.; Nanoparticles: pharmacological and toxicological importance. **BR, J. Pharmacol.** v. 150, p. 552-558, 2007.
- MISRA, S.K.; DYBOWSKA, A.; BERHANU, D.; LUOMA, S.; VALSEMI-JONES, E. The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. **Sci. of the Total Environ.** v.438, p. 225-232, 2012
- MOORE, M.N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? **Environ. Int.**, v.32, p.967–976, 2006.
- MU, H; YINGUANG, C. Long-term effect of ZnO nanoparticles on waste activated sludge anaerobic digestion. **Water research.**, v. 45, p. 5612-20., 2011.
- MUELLER, N.C.; NOWACK, B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. **Environ. Sci. Technol.**, v.42, p.4447–4453, 2008.
- MURPHY, S. D. Pesticides. Em: The basic science of poisons. Macmillian, NY. p, 519-581, 1986.
- NA, K.; LEE, T.B.; PARK, K.H.; SHIN, E.K.; LEE, Y.B.; CHOI, H.K. Self-assembled nanoparticles of hydrophobically modified polysaccharide bearing vitamin H as a targeted anti-cancer drug delivery system. **Eur. J. Pharm. Sci.** v.18, p.165–173, 2003.
- NEL, A.; XIA, T.; MADLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel, **Science**, v. 311, p.622–627, 2006.
- NEMMAR, A.; HOET, P.H.M.; VANQUICKENBORNE, B.; DINSDALE, D.; THOMEER, M.; HOYLAERTS, M.F.; VANBILLOEN, H.; MORTELMANS, L.; NEMERY, B. 2002. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. **Circulation** 105, 411–414.
- NOWACK, B., BUCHELI, T, D., Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environ. Poll.**, v.150, p.5-22, 2007.
- OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology. An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environ. Health Perspect.**, v.113, p.823–839, 2005.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquat. Toxicol.**,74, 53–69. 2005
- PAYNE, J.F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W.; FANCEY, L.L. Acetylcholinesterase, and old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Mar. Poll. Bull.**, v. 32, p. 225-23, 1996.
- PEAKALL, D.W. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. **Ecotoxicol**, v.3, p. 173-179, 1994.
- PÉREZ, S.; FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Analysis, behavior and ecotoxicity of carbon-based nanomaterials in the aquatic environment. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, p.820-832, 2009
- QUINLAN, G.J.; GUTTERIDGE, J.M.C. Carbonil assays for oxidative damages to protein, in: TANIGUCHI, N.; GUTTERIDGE, J.M.C. (Ends.). Experimental protocol for reactive oxygen and nitrogen species. **New York: Oxford University.** p. 257-258, 2000.
- RABITTO, I.S.; BASTOS, W.R.; ALMEIDA, R.; ADILSON, A.; HOLANDA, I.B.B.; GALVÃO, R.C.F.; FILIPAK NETO, F.; MENEZES, M.L.; SANTOS, C.A.M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.

Mercury and DDT exposure risk to fish-eating human populations in Amazon. **Environment International**. v. 37, p. 56 – 65. 2011.

ROTHERN-RUTISHAUSER, B. M., SCHÜRCH, S., HAENNI, B., KAPP, N., GEHR, P. Interaction of fine particles with red blood cells visualizes with advanced microscopy techniques. **Environ. Sci. Technol.** v. 40, p. 4353-4359, 2006.

SALVI, S.; HOLGATE, S.T.; Mechanisms of particulate matter toxicity. **Clin. Exp. Allergy**., v.29, p.1187–1194, 1999.

SHAW, B., HANDY, R; Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals versus metal ions. **Environ. Inter.**, v. 37, p. 1083-97, 2011.

SHIMADA, A.; KAWAMURA, N.; OKAJIMA, M.; KAEWAMATAWONG, T.; INOUE, H.; MORITA, T. Translocation pathway of the intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the blood circulation in the mouse. **Toxicol. Pathol.**, v.34, p.949–957, 2006.

SHVEDOVA, A. A., KISIN, E.R., MERCER, R., MURRAY, A. R., JOHNSON, V. J., POTAPOVICH, A. I., TYURINA, Y. Y., GORELIK, O., AREPALLI, S., SCHWEGLER-BERRY, D., HUBBS, A. F., ANTONINI, J., EVANS, D. E., KU, B. K., RAMSAY, D., MAYNARD, A., KAGAN, V. E., CASTRANOVA, V., BARON, P. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single walled carbon nanotubes in mice. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.** v. 289, p. 698-708, 2005.

SINGH, S.; THIYAGARAJAN, P.; KANT, K.M.; ANITA, D.; THIRUPATHIAH. S.; RAMA N, et al. Structure, microstructure and physical properties of ZnO based materials in various forms: bulk, thin film and nano. **J. Phys. D. Appl. Phys.**, v.40, p.6312–6327, 2007.

STEGEMAN, J.J., BROUWER, M., RICHARD, T.D.G., FÖRLIN, L., FOWLER, B.A., SANDERS, B.M., VAN VELD, P.A.. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M., Jr, Bergman, H.L. (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress*. **Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA**, pp. 235-335, 1992.

TONE, V., DONALDSON, K., Nanotoxicology: signs of stress, *Nat. Nanotechnol.* v.1, p.23-24, 2006.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphydril groups in tissues with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.** v.25, p.192-205, 1968.

SHARMA, V., ANDERSON, D., DHAWAN, A. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). **Apoptosis**. V. 17, p. 858-870, 2012.

STUM, A.; ILVA DE ASSIS, H.C.; HANSEN, P.D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potencal use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Mar. Environ. Res.**, v. 47, p. 389-398, 2000.

SUH, W.H.; SUSLICK, K.; STUCKT, G.; SUH, Y. Nanotechnology, nanotoxicology and neuroscience. **Prog. Neurobio.**, v.87, p.133-170, 2009.

SVERLIJ, S.B. *Prochilodus lineatus*, 2005. 1 Fotografia, color. Disponível em: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/55/Prochilodus_lineatus.jpg. Acesso em 08/01/2013

TAKENAKA, S.; KARG, E.; ROTH, C.; SCHULZ, H.; ZIESENIS, A.; HEINZMANN, U.; SCHRAMMEL, P.; HEYDER, J. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. **Environ. Health Perspect.**, v.109, p.547–551, 2001.

TANG, J.L.; XIONG, L.; WANG, S.; WANG, J.; WAN, Z.; XI, T. Influence of silver nanoparticles on neurons and blood brain barrier via subcutaneous injection in rats. **Appl. Surf. Sci.**, v, 255, p. 502-504, 2008.

THE ROYAL SOCIETY AND THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. The Royal Society and the Royal Academy of Engineering. **Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties**. London, UK, 2004.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxicol. Pharm.**, v.13, p. 57-149, 2003.

WANG, C.T.; RO, S.H. Surface nature of nanoparticle gold/iron oxide aerogel catalysts. **J. Non-Crystal. Sol.**, v.352, p.35, 2006.

WANG, J.; ZHOU, G.; CHEN, C.; YU, H.; WANG, T.; MA, Y.; JIA, G.; YUXI, G.; LI, B.; SUN, J.; LI, Y.; JIAO, F.; ZHAO, Y.; CHAI, Z. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. **Toxicol Lett.**, v.168, p.76–85, 2007.

WANG, Z., ZHAO, J., LI, F., GAO, D., XING, BAOSHAN. Adsorption and inhibition of acetylcholinesterase by different nanoparticles. **Chemos.**, v. 77, p. 67-73, 2009

WOODROW WILSON INTERNATIONAL CENTER FOR SCHOLARS. Assuring the safety of nanomaterials in food packaging: the regulatory process and key issues. Disponível em: http://www.nanotechproject.org/process/assets/files/6704/taylor_gma_pen_packaging1.pdf, 2008.

XIONG, D., FANG, T., YU, L. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. **Sci. Tot. Environ.**, v. 409, p. 1444-52, 2011.